

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**  
**Facultad de Ciencias**

Departamento de Química Inorgánica

**NUEVA RUTA PARA LA OBTENCIÓN DE  
MATERIALES DE COMPOSICIÓN  
EUTÉCTICA DENTRO DEL SISTEMA  
WOLLASTONITA-FOSFATO TRICÁLCICO**

**Memoria presentada por:**

**Marlin C. Magallanes Perdomo**

Para optar al grado de:  
Doctora en Ciencias Químicas

**Bajo la dirección de:**

**Dra. M<sup>a</sup> Pilar Pena Castro**

**Dr. Antonio H. De Aza Moya**

Instituto de Cerámica y Vidrio (ICV-CSIC)  
Madrid, Mayo de 2010



*A mi familia.*





**Este trabajo se ha llevado a cabo en el departamento de Cerámica del Instituto de Cerámica y Vidrio-ICV (CSIC) en el marco del proyecto:**

CICYT MAT12749-C02-01 *“Síntesis y obtención de nuevos biomateriales de fosfato tricálcico en los sistemas  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Mg}_3(\text{PO}_4)_2$ ;  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-CaSiO}_3$  y  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2\text{-Mg}_3(\text{PO}_4)_3\text{-CaSiO}_3$ . Estudios in vitro”.*



## AGRADECIMIENTOS

En el marco institucional agradezco al Ministerio de Ciencia e Innovación de España por la financiación de mis estudios doctorales así como, las diversas estancias realizadas en el exterior a través de la concesión de la beca FPU AP2005-5181.

Quiero agradecer a la Dra. Prof. M<sup>a</sup> del Pilar Pena y al Dr. Antonio H. De Aza por su disposición a solicitar la beca FPU, gracias por la confianza, amabilidad, entendimiento y asistencia profesional con la que han dirigido esta tesis.

Agradezco a la Dra. Rosa María Medina Martínez, del departamento de química inorgánica de la Universidad Autónoma de Madrid, por haber aceptado la tutela de la presente tesis.

El carácter multidisciplinar de esta investigación ha requerido la participación de diferentes personas e instituciones de España y del exterior, por lo tanto agradezco al:

- Prof. Dr. Fernando Monteiro, Prof. Dr. Mario Barbosa, Dra. Maria Pia Ferraz, Dra. Sandra Teixeira, Alis Mateus y Alejandro Pelaez del Instituto de Engenharia Biomedica de Porto-Portugal, por la dedicación esmerada ofrecida durante mi estancia de dos meses y por brindarme una nueva visión de los biomateriales (la interacción células-material).
- Prof. Dr. Asa Barber, Dra. Zofia Luklinska, Mick Willis de la Universidad Queen Mary de Londres-Reino Unido, por el apoyo, paciencia y ayuda brindada durante mi estancia en sus laboratorios y por todo el conocimiento transmitido sobre el estudio de los materiales mediante microscopía electrónica de transmisión.
- Dr. Jesús Sainz y Dra Isabel Sobrados del Instituto de Ciencia de Materiales de Madrid, por la ayuda ofrecida en la técnica de resonancia magnética nuclear. Igualmente, agradezco al Dr. José Bartolomé Gómez, de la misma institución, por facilitar el equipo de medida para realizar parte de los ensayos mecánicos.
- Un especial agradecimiento a la Dra. Piedad N. De Aza de la Universidad de Elche, por las invitaciones para impartir conferencias en sus instalaciones y por su ayuda en los estudios *in vitro* en suero fisiológico artificial.

Agradezco al centro de adscripción de la beca predoctoral, Instituto de Cerámica y Vidrio del Consejo Superior de Investigaciones Científicas, y a su personal, en especial:

- Prof. Dr. Salvador De Aza, Dr. Miguel Angel García, Dra. M<sup>a</sup> Antonia Sainz, Dra. Sara Serena, Ismael García, Alberto Pérez, Dr. Raúl García y Leticia Carvajal del grupo de diagrama de equilibrio de fases, por el apoyo recibido durante estos cuatro años.
- Prof. Dra. Alicia Durán del grupo de vidrios, por su disposición a responder mis dudas sobre vidrio y a Juan Vargas por ayudarme y enseñarme a colar vidrio.
- Consuelo Moncayo, Bartolomé Piñero, Paloma Alarcón y Ramón Escribano, del personal de administración, por ayudarme con todos los trámites burocráticos que siempre son tan importantes.

- A los compañeros de servicios generales: Luis Contreras, Marisa Rubio, Pedro Luque, Socorro Benito, Enrique Díaz, Dr. Nilo Cornejo, Carlos Berlanga, José Jiménez y Ana García, por la ayuda ofrecida en cada una de las técnicas de caracterización que llevan en el instituto.
- A las investigadoras: Dra. Paloma Recio y Dra. Carmen Pascual por la ayuda brindada cuando surgían problemas o dudas con el equipo de difracción de rayos X o con el análisis de los datos generados por esta técnica.
- Al Dr. Francisco José Valle por la ayuda recibida en las técnicas de caracterización química en especial en la fluorescencia de rayos X.
- A los investigadores: Dra. Marina Villegas, Dra. Begoña Ferrari, Dr. Javier Sánchez, Dra. Yolanda Castro y Dra. Eva Chinarro por los momentos compartidos.
- A los investigadores pre y postdoctorales, que han estado o están en el instituto, por la ayuda, los buenos momentos y la agradable compañía:

Isabel Gonzalo, Paola Parente, Sandra Cabañas, Nerea Mascaraque, María Verde, Sofía Perez, Emilio López-López, Carolina Rosero, Elena Palacios, Marta Palacios, María Canillas, Jesús Gonzalez, Macarena, Julián Jiménez, Joana Queiroz, Eugenio García, Yolanda Iglesias, Olga Burgos, Teresa Durán, Berta Moreno, Domingo Guinea, Noemi Arconada, Jadra Mosa, Laura Villaseca, Sergio Pellice, M<sup>a</sup> Guadalupe Navarro, Cristina Guerrero, Fernando Rubio, Pilar Leret, Israel Lorite.

En el plano personal quiero agradecer a mi familia (Fernando, Elizabeth, Rafael, Lismar, Rafael I., Henry J., Paola, Marian, Diego, Yoxi, Henry, Beatriz, Julio, Sergio y Karina) por su apoyo incondicional.

Gracias a todos.

## RESUMEN

En la presente tesis doctoral se ha desarrollado un vitrocerámico con la misma composición química que el Bioeutéctico<sup>®1</sup>, composición eutéctica del sistema wollastonita (W)-fosfato tricálcico (TCP), pero con una microestructura totalmente diferente. Para ello se ha utilizado el método vitrocerámico que permite diseñar a medida el tamaño, la forma y la microestructura del material. Además este método permite fabricar piezas grandes y con formas complejas de una manera económica mediante las técnicas habituales y bien establecidas del procesamiento de materiales vítreos (fusión, conformado en caliente) y vitrocerámicos (desvitrificación controlada).

El vidrio eutéctico obtenido mediante el proceso habitual en la fabricación de vidrios de fusión y colado se caracterizó desde un punto de vista: *Térmico*: se determinó el coeficiente de expansión térmica por dilatometría, la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) mediante análisis térmico diferencial (ATD) y dilatometría. Se estableció la temperatura de fusión, por microscopía de calefacción y análisis térmico diferencial (ATD). La temperatura de cristalización se estableció por ATD. *Estructural*: por resonancia magnética nuclear (RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ ). *Microestructural*: por microscopía electrónica de transmisión (MET) con difracción de un área seleccionada (DAS). *Mecánico*: se determinó el módulo de rotura (MOR) mediante el ensayo de flexión en tres puntos; la dureza Vickers ( $H_v$ ) y la resistencia a la propagación de grieta ( $K_{IC}$ ) mediante indentación; y el módulo de Young ( $E$ ) mediante la técnica de resonancia. Además, se realizaron *estudios in vitro* en suero fisiológico artificial (SFA) y mediante cultivos celulares de células MG63 (células de osteosarcoma humano), con el fin de estudiar la bioactividad y biocompatibilidad del vidrio.

Los resultados de RMN-MAS indican que la estructura del vidrio está formada por una matriz rica en silicatos con especies  $Q^1$ ,  $Q^2$  y  $Q^3$ , en la que están dispersas regiones ricas en calcio y fósforo. La señal mayoritaria de Si corresponde al tipo  $Q^2$ , lo que indica la presencia mayoritaria de tetraedros de silicato formando cadenas o anillos.

El vidrio obtenido presenta una alta bioactividad en SFA, formando una capa de fosfatos de calcio de 24  $\mu\text{m}$  después de 21 días. Las células MG63 han presentado una alta

---

<sup>1</sup> Este material consiste en colonias cuasi-esféricas formadas por laminillas alternadas de pseudowollastonita y  $\alpha$ -TCP con una morfología eutéctica irregular.

adhesión y proliferación celular sobre la superficie del vidrio después de 3 y 7 días, por lo tanto el vidrio es biocompatible.

De la caracterización del vidrio y de la comparación con otros vidrios alcalinos/alcalinotérreos, descritos en la bibliografía, se ha encontrado una relación entre la estructura del vidrio y su comportamiento bioactivo en SFA. Estableciéndose una correlación que permite determinar el espesor de la capa de fosfatos de calcio formada en SFA después de 3 días en función del parámetro de Stevels (Y) de los vidrios.

Para establecer el tratamiento térmico idóneo para obtener un vitrocerámico con microestructura y mineralogía óptima partiendo del vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP se realizaron estudios de desvitrificación (isotérmicos y no-isotérmicos). El estudio del proceso de desvitrificación no-isotérmico se ha realizado *in situ* mediante difracción de neutrones desde temperatura ambiente hasta 1375°C en un horno de vacío. Los datos obtenidos se han comparado con los de ATD y con los de muestras tratadas térmicamente en aire y posteriormente caracterizadas por difracción de rayos X (DRX) y microscopía electrónica de barrido con microanálisis mediante un espectrómetro de dispersión de energías de rayos X (MEB-EDS).

El estudio isotérmico de la desvitrificación se ha realizado con el objetivo de determinar el diagrama Transformación-Tiempo-Temperatura (TTT) del vidrio. En este sentido, se han realizado tratamientos térmicos a diferentes temperaturas y durante diferentes períodos de tiempo. Después del tratamiento térmico las muestras se han caracterizado mediante: DRX, MEB-EDS, MET-DAS y RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ .

Los resultados experimentales indican que la desvitrificación del vidrio comienza a ~870°C, con la cristalización de una apatita deficiente en calcio, seguidamente a ~1006°C cristaliza la fase wollastonita-2M ( $\text{CaSiO}_3$ ). A 1375°C el material presenta una microestructura formada por colonias cuasi-esféricas formadas por laminas alternadas de pseudowollastonita ( $\text{CaSiO}_3$ ) y  $\alpha$ -TCP ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). La microestructura a 1375°C, es similar a la del material obtenido mediante solidificación controlada de la composición eutéctica del sistema  $\text{CaSiO}_3$ -  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  (W-TCP Bioeutéctico<sup>®</sup>).

Entre los diferentes materiales que se pueden conseguir al variar el tratamiento térmico, se decidió obtener un vitrocerámico con apatita y wollastonita 2M, ya que la primera es una

fase biocompatible y presenta una fuerte unión al hueso, mientras que la segunda mejora las propiedades mecánicas del material y además es una fase reabsorbible.

De los estudios de desvitrificación se estableció un tratamiento térmico, para obtener un vitrocerámico conteniendo las fases antes mencionadas, el cual consta de dos etapas una de 2 horas a 820°C y otra de 1 hora a 1100°C.

El vitrocerámico obtenido ha sido caracterizado *químicamente*: mediante FRX, *estructuralmente*: mediante RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ , *mineralógicamente*: análisis cualitativo y cuantitativo (incluyendo la fase amorfa) mediante DRX y la metodología Rietveld, *microestructuralmente*: mediante MEB-EDS y MET-DAS, *mecánicamente*: y E,  $H_v$  y  $K_{IC}$ . Además se ha estudiado su *bioactividad* en SFA y su *biocompatibilidad* mediante ensayos con cultivos celulares de células madre de médula ósea humana (HBMSC).

La caracterización del vitrocerámico indica que las fases presentes en el mismo son: apatita deficiente en calcio (44,8 % peso), wollastonita 2M (28,0 % peso) y fase amorfa residual (27,2%). De los estudios Rietveld y del cálculo mediante análisis racional se ha encontrado que la fase apatita deficiente en calcio presenta pequeñas cantidades de  $\text{SiO}_2$  (0,45 moles) y que la fase amorfa presenta la siguiente composición en peso: CaO 43,5 %,  $\text{SiO}_2$  55,9 % y  $\text{P}_2\text{O}_5$  0,6%. Las propiedades mecánicas (E,  $H_v$  y  $K_{IC}$ ) del vitrocerámico son superiores a las del vidrio original. Los estudios *in vitro* indican que es bioactivo, formando una capa de carbohidroxiapatita después de 7 días de inmersión en SFA y además las células HBMSC sembradas sobre su superficie presentan alta adhesión y proliferación celular, lo que indica que es biocompatible.

El vitrocerámico desarrollado en la presente tesis presenta propiedades mecánicas y comportamiento *in vitro* cercano al Cerabone<sup>®</sup>, biomaterial que se usa actualmente en aplicaciones biomédicas, el cual es obtenido mediante sinterización-cristalización de compactos obtenidos por prensado isostático a 200 MPa de polvo de vidrio (~5  $\mu\text{m}$ ). El proceso de obtención usado en la presente tesis: desvitrificación de un vidrio en masa, es decir sin moler y prensar el vidrio, es un proceso de preparación más simple, con una menor susceptibilidad de contaminación, y por ende un menor coste de fabricación de los implantes.

## ABSTRACT

This thesis discusses the development of a new glass-ceramic composed of the eutectic point composition from the wollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ ) – tricalcium phosphate ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , W–TCP system. The designed glass-ceramic has the same chemical composition as the ceramic material denominated Bioeutéctico<sup>2</sup>, but with a mineralogy and microstructure completely different.

The manufacturing of the glass-ceramic material was based on the glass-ceramic processing science. This method permits to tailor the size, shape and microstructure of the material. Furthermore, this method allows production of large pieces with complex shapes, by a variety of well-known inexpensive processing techniques.

The glass-ceramic parent glass was obtained by a glass processing conventional method based on melting and casting. The bulk eutectic glass was characterized using a variety of different techniques. *Thermal characterization* method determined the thermal expansion coefficient ( $\alpha$ ) using dilatometry, while the glass transition temperature ( $T_g$ ) was obtained by the combined use of differential thermal analysis (DTA) and dilatometry. Additionally, the melting point was established by hot stage optical microscopy and DTA, while the crystallization temperature by DTA. *Structural characterization* in terms of nuclear magnetic resonance ( $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR) was also performed. *Microstructural characterization* involved various microscopy techniques in order to examine the glass specimens up to transmission electron microscopy (TEM) resolution level, and in conjunction with selected area diffraction pattern (SAD). *Mechanical characterization* has determined the following properties: the rupture modulus (MOR) using the three point bending test, Vickers hardness ( $H_v$ ) and toughness ( $K_{IC}$ ) by the indentation method. The Young's modulus (E) was also established by resonance technique. Furthermore, in order to study the bioactivity and biocompatibility of the eutectic glass *in vitro*, different studies were conducted in simulated body fluid (SBF) and in cell cultures of MG63 cells (human osteosarcoma cells) respectively.

---

<sup>2</sup> This material consists of quasispherical colonies formed by alternating lamellae of pseudowollastonite and  $\alpha$ -TCP with a morphology corresponding to irregular eutectic structure.



The MAS-NMR results showed that the glass structure consisted of a rich silicates matrix with  $Q^1$ ,  $Q^2$  and  $Q^3$  species and scattered regions rich in calcium and phosphorus. The preponderance of Si signal, corresponding to the  $Q^2$  type, indicated the abundance of tetrahedral silicates presence that can form chains or rings.

The glass displayed a high bioactivity in SBF, forming a 24  $\mu\text{m}$  thick calcium phosphate layer after 21 days of exposure. On the other hand, after 3 and 7 days of exposure to the MG63 cells, strong adhesion and quick proliferation of the cells was detected on the glass surface, indicating the biocompatible character of the glass.

A relationship between a structure and bioactive glass properties in SBF was established by taking into account the eutectic glass characterization results and comparison with other alkali/alkaline earth glasses properties described in the literature. A specific correlation was found between the thicknesses of the calcium phosphate layer formed during the immersion of the glass in SBF after 3 days and the glass Stevels parameter (Y).

The devitrification studies were thoroughly conducted in order to establish the appropriate heat treatment conditions for manufacturing of the W-TCP eutectic glass-ceramic from the parent glass. Isothermal and non-isothermal studies were carried out.

The non-isothermal devitrification study was carried out in situ by neutron diffraction between the room temperature and 1375° C in a vacuum furnace. The data were compared with those of DTA and the samples heat treated in air and subsequently characterized by X-ray diffraction (XRD) and Field Emission Scanning Electron Microscopy including chemical microanalysis using Energy Dispersive X-ray Spectrometer technique (SEM-EDS).

The isothermal devitrification study was performed in order to determine the Time-Temperature-Transformation (T-T-T) diagram of the glass. In this way, the heat treatment procedures were performed at different temperatures over various period of time. Afterwards, the samples were characterized by XRD, SEM-EDS, TEM-SAD and  $^{31}\text{P}$  and  $^{29}\text{Si}$  MAS-NMR.

The experimental results indicated that the devitrification of the glass begins with the crystallization of calcium-deficient apatite at  $\sim 870^\circ\text{C}$ , followed by wollastonite-2M crystallization at  $\sim 1006^\circ\text{C}$ . At  $1375^\circ\text{C}$  the material has a microstructure of quasi-spherical

colonies composed of pseudowollastonite and  $\alpha$ -TCP alternating sheets. The microstructure at 1375 °C is similar to the eutectic composition (Bioeutectic<sup>®</sup>) produced by controlled solidification method of the W-TCP system.

It was also found, that it is possible to obtain a wide range of bio-glass-ceramics containing different crystalline phases, using the eutectic composition of the W-TCP binary system, through the appropriate design of thermal treatments. Among the different materials' compositions that can be produced by varying the heat treatment, it was possible to obtain a glass ceramic containing apatite and wollastonite-2M. This conclusion was based on the fact that the first phase, apatite, is biocompatible and has a strong chemical bonding, while the other phase, wollastonite-2M, could improve the mechanical properties of materials and also has resorbable properties..

The proposed thermal cycle that would allow the devitrification process of the bulk glass to obtain a glass-ceramic containing apatite and wollastonite-2M, as mentioned above, was established from the previous devitrification studies. This thermal cycle consisted of two dwell-steps, one of 2 hours at 820°C and another of 1 hour at 1100°C.

The glass-ceramic obtained was characterized as follows: *Chemical characterization*: X-ray Fluorescence (XRF) was used. *Structural characterization*: it was performed by <sup>31</sup>P and <sup>29</sup>Si MAS-NMR. *Mineralogical characterization*: qualitative and quantitative analyses (including the amorphous phase) were performed by the Rietveld method. *Microstructural characterization*: SEM-EDS and TEM-SAD were used and *mechanical characterization*: E, H<sub>v</sub> and K<sub>IC</sub> were determined.

Furthermore, in order to study the bioactivity and biocompatibility of the eutectic glass-ceramic, various *in vitro* studies were conducted in simulated body fluid (SBF) and in cell culture media containing human bone marrow stem cells (HBMSC) respectively.

The glass-ceramic characterization based on the Rietveld analysis indicated that the crack-free specimens contained 44.8 wt% Ca-deficient apatite, 28.0 wt% wollastonite-2M and 27.2 wt% of amorphous phase. A combination of data from the Rietveld and rational analyses concluded that the calcium deficient apatite contained small amount of SiO<sub>2</sub> (0.45 mol) phase in a solid solution, and that the amorphous phase was composed of (weight percent): CaO 43.5%, SiO<sub>2</sub> 55.9% and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.6%. The new glass-ceramic had mechanical properties (K<sub>IC</sub>, H<sub>v</sub> and E) higher than the original parent glass. *In vitro* studies indicated

that the present glass-ceramic was bioactive, forming a layer of carbonated hydroxyapatite after 7 days of immersion in SBF, and that the material was also biocompatible, as the HBMSC seeded onto their surfaces exhibited strong cell adhesion and quick proliferation.

The glass-ceramic developed in the present studies, presents mechanical properties and in vitro behavior close to the Cerabone®. Cerabone® A/W is one of the glass-ceramics which provided good clinical success. It is constituted by two crystalline phases: oxyfluorapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{O}, \text{F})$  and wollastonite-2M, and also residual vitreous phase. Cerabone® A/W is obtained by grinding a glass to an average particle size of  $5 \mu\text{m}$  and then by isostatic pressing, at 200 MPa to the desired shape, followed by a thermal densification cycle.

The process used in this study involved devitrification of a bulk glass, in others words excluding grinding and isostatic pressing processes, hence the whole manufacturing process was made significantly simpler, less susceptible to contamination, and therefore of lower overall manufacturing cost of implants.

# ÍNDICE

## **CAPÍTULO I**

I.INTRODUCCIÓN.....	3
I.1.Biomateriales como sustitutos óseos.....	3
I.1.1. Anatomía y fisiología del hueso.....	4
I.2.Clasificación de los biomateriales.....	5
I.2.1.Según el tipo de respuesta del organismo.....	5
I.2.2.Según sus características físico-químicas.....	6
I.2.3.Según su evolución.....	10
I.3. Materiales vítreos y vitrocerámicos bioactivos.....	13
I.3.1.Vidrios bioactivos.....	14
I.3.2.Vitrocerámicos bioactivos.....	15
I.4. Bioactividad. Ensayos <i>in vitro</i> .....	19
I.4.1.Ensayos en Suero Fisiológico Artificial (SFA).....	19
I.4.2.Mecanismos de formación de hidroxiapatita (HA) en la superficie del biomaterial.....	21
I.5. Biocompatibilidad. Ensayos <i>in vitro</i> .....	22
I.5.1. Cultivos celulares.....	22
I.5.2. Líneas celulares.....	23
I.5.3.Ensayos de biocompatibilidad.....	25
REFERENCIAS.....	27

## **CAPÍTULO II**

II. PROPÓSITO DEL TRABAJO.....	35
II.1.- Objetivo de la investigación.....	38
II.2.- Obtención y caracterización del vidrio de composición eutéctica del sistema wollastonita-fosfato tricálcico.....	39
II.2.1.-Caracterización del vidrio obtenido.....	39
II.3.-Estudio de la desvitrificación del biovidrio de composición eutéctica del sistema Wollastonita - Fosfato Tricálcico.....	40
II.3.1 Estudio no-isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico.....	40
II.3.2 Estudio isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico.....	40
II.4.-Diseño, Preparación y caracterización de un vitrocerámico dentro del sistema seleccionado.....	41
II.4.1.-Caracterización del vitrocerámico obtenido.....	41
REFERENCIAS.....	42

## **CAPÍTULO III**

III. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES.....	47
III.1. Técnicas de análisis de fases.....	47
III.1.1. Difracción de rayos X (DRX).....	47
III.1.2.Refinamiento Rietveld.....	48
III.1.3.Difracción de neutrones.....	49
III.2. Estudio microestructural .....	50
III.2.1.Microscopía óptica de luz reflejada (MOLR).....	50
III.2.2. Microscopía electrónica de barrido emisión de campo (MEB-EC-EDS).....	51

III.2.3. Microscopía electrónica de transmisión y difracción de un área seleccionada (MET-DAS).....	52
III.2.4. Microanálisis en microscopia electrónica.....	53
III.3. Estudio estructural.....	54
III.3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN).....	54
III.4. Técnicas de análisis térmico.....	56
III.4.1. Dilatometría.....	56
III.4.2. Análisis térmico diferencial (ATD).....	57
III.4.3. Microscopía de calefacción.....	58
III.5. Técnicas de análisis mecánico.....	59
III.5.1. Módulo de elasticidad.....	59
III.5.2. Resistencia a la fractura.....	61
III.5.3. Dureza Vickers.....	62
III.5.4. Tenacidad.....	63
III.6. Técnicas de análisis químico.....	63
III.6.1. Fluorescencia de rayos X (FRX).....	63
III.6.2. Análisis ICP.....	64
III.7. Ensayos de Bioactividad <i>in vitro</i> en Suero Fisiológico Artificial (SFA)..	65
III.8. Ensayos de Biocompatibilidad <i>in vitro</i> en cultivos celulares.....	68
REFERENCIAS.....	71

#### **CAPÍTULO IV**

IV. MATERIAS PRIMAS.....	77
IV.1 Sílice.....	77
IV.2 Carbonato de calcio.....	79
IV.3 Fosfato tricálcico.....	80
IV.3.1 Precursor de fosfato tricálcico.....	80
IV.3.2 Tratamiento térmico.....	81
REFERENCIAS.....	85

#### **CAPÍTULO V**

V. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL VIDRIO DE COMPOSICIÓN EUTÉCTICA DEL SISTEMA WOLLASTONITA - FOSFATO TRICÁLCICO....	89
V.1. Introducción.....	89
V.2. Obtención del vidrio eutéctico.....	90
V.3. Caracterización del vidrio eutéctico.....	92
V.3.1. Caracterización química.....	93
V.3.2. Caracterización estructural.....	93
V.3.3. Caracterización térmica.....	97
V.3.4. Caracterización mecánica.....	102
V.3.5. Ensayos <i>in vitro</i> .....	103
V.4. Discusión.....	110
V.5. Conclusiones.....	115
V.5. Conclusions.....	115
REFERENCIAS.....	116

## **CAPÍTULO VI**

VI. ESTUDIO DE LA DESVITRIFICACIÓN DEL VIDRIO EUTÉCTICO.....	121
VI.1 Introducción.....	121
VI.2 Estudio no-isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico.....	121
VI.2.1. Análisis térmico diferencial (ATD).....	121
VI.2.3. Tratamientos Térmicos.....	121
VI.2.3. Difracción de neutrones.....	128
VI.2.4.Discusión.....	131
VI .3. Estudio isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico.....	133
VI.3.1. Determinación de la zona opal.....	134
VI.3.2. Estudios de la zona cristalina.....	138
VI.3.3. Discusión.....	142
VI .4. Conclusiones.....	143
VI .4. Conclusions.....	144
REFERENCIAS.....	146

## **CAPÍTULO VII**

VII. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE UN NANOMATERIAL VITROCERÁMICO CONTENIENDO APATITA Y WOLLASTONITA 2M.....	151
VII.1. Introducción.....	151
VII.2. Obtención del vitrocerámico.....	151
VII.3. Caracterización físico-química del vitrocerámico.....	152
VII.3.1. Composición química.....	152
VII.3.2. Caracterización Microestructural.....	152
VII.3.3. Propiedades mecánicas.....	157
VII.4. Discusión.....	157
VII.5. Conclusiones.....	160
VII.5. Conclusions.....	160
REFERENCIAS.....	161

## **CAPÍTULO VIII**

VIII. ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DEL NANOMATERIAL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE ESTUDIOS IN VITRO EN SUERO FISIOLÓGICO ARTIFICIAL.....	165
VIII.1.Introducción.....	165
VIII.2.Condiciones de Estudio.....	165
VIII.3.Resultados.....	166
VIII.3.1.Análisis de la concentración de iones en el SFA.....	166
VIII.3.2.Estudio de la superficie del vitrocerámico.....	168
VIII.3.3.Estudio de la sección transversal del vitrocerámico.....	172
VIII.4.Discusión.....	175
VIII.5.Conclusiones.....	179
VII.5. Conclusions.....	179
REFERENCIAS.....	181

## **CAPÍTULO IX**

IX. ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE CULTIVO CELULARES.....	185
IX.1 Introducción.....	185
IX.2 Condiciones de estudio.....	185
IX.2.1 Células Madre de Médula Ósea Humana.....	185
IX.2.2 Vitrocerámico.....	187
IX.2.3 Siembra de células.....	180
IX.2.4 Estudios de morfología y adhesión celular.....	180
IX.2.5 Cuantificación celular.....	180
IX.3 Resultados.....	189
IX.3.1 Morfología y adhesión celular.....	189
IX.3.2 Cuantificación celular .....	200
IX.4 Discusión.....	201
IX.5 Conclusiones.....	202
IX.5 Conclusions.....	203
REFERENCIAS.....	204
<b><u>CONCLUSIONES FINALES</u></b> .....	207
<b><u>OVERALL CONCLUSIONS</u></b> .....	211
ANEXOS.....	215

# **CAPÍTULO I**

## **INTRODUCCIÓN**





## I.INTRODUCCIÓN

### I.1.Biomateriales como sustitutos óseos

En los últimos años, el campo de los biomateriales ha experimentado un gran avance gracias a una importante promoción en la investigación, desarrollo e innovación (I+D+i), como consecuencia de una mayor demanda debida al incremento de la esperanza de vida y al aumento de las patologías del aparato locomotor en la sociedad moderna.

Existen diferentes definiciones de biomaterial, quizás debido a que este campo incluye diferentes disciplinas. Una de las más consensuadas ha sido la establecida por Williams [1]:

*“Un biomaterial es un material no vivo utilizado en dispositivos médicos destinado a interactuar con el sistema biológico”.*

Como los biomateriales han evolucionado, tal y como se verá en la clasificación de éstos según su evolución, la definición propuesta en un principio por Williams ha sido modificada por Klaus Jandt [2] para establecer así una definición contemporánea del término biomaterial:

*“Un biomaterial es un material vivo o no vivo hecho por el hombre o modificado por él, destinado a interactuar con un sistema biológico para evaluar, tratar, aumentar o reemplazar cualquier tejido, órgano o función del cuerpo”.*

El estudio y desarrollo de materiales para su empleo como sustitutos óseos se ha incrementado en los últimos años, se espera que para el 2020 las personas mayores de 50 años afectadas por enfermedades óseas sea el doble que en la actualidad [2].

Entre los biomateriales de mayor interés para reconstrucción de defectos óseos se encuentran las cerámicas de fosfatos y silicofosfatos de calcio, dado que presentan reconocidas propiedades osteoconductivas y son capaces de formar un armazón que en forma progresiva es sustituido por tejido óseo diferenciado [2].

### **I.1.1. Anatomía y fisiología del hueso**

El hueso es un órgano complejo que presenta una variedad de papeles críticos en la fisiología humana, generalmente se clasifica según su forma (largo, corto, plano o irregular). Por lo general, el hueso está formado por componentes inorgánicos, que representan el 70% de su peso en seco, y un amplio rango de componentes orgánicos, principalmente el colágeno de tipo I, proteínas, y por elementos celulares que integran el resto de la matriz orgánica. Los huesos presentan dos regiones, una que rodea el perímetro del hueso, que consiste en un hueso compacto o cortical, este alcanza el 80% de la masa total del hueso, y otro que se encuentra en la parte interna del hueso y es menos denso que el hueso compacto, se llama hueso esponjoso [3].

El componente inorgánico del hueso y los dientes está formado por fosfatos de calcio, en particular por hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , HA), por lo que se emplean como material para implantes sin efectos citotóxicos, presentando excelente biocompatibilidad con los tejidos duros, músculos y piel, además de tener la capacidad de unirse directamente al hueso [4-7].

Los biomateriales que tienen utilidad como sustitutos óseos son los que al ser implantados tienen la capacidad de promover la regeneración o reparación ósea, por lo que pueden ser empleados, con éxito, en el tratamiento de fracturas con pérdida de tejido óseo, en la solución de cavidades generadas por la extirpación de tumores óseos o para rellenar defectos óseos secundarios. Se considera que los biomateriales ideales son aquellos que progresivamente son sustituidos por tejido óseo neoformado del hueso receptor [3].

Los actuales avances en I+D+i en el campo de los materiales cerámicos permiten el diseño, síntesis y obtención de biomateriales con propiedades óptimas, que al ser ensayados mediante estudios *in vitro*, en cultivos celulares, e *in vivo*, en animales de experimentación, pueden ser correctamente evaluados y definidos para su posterior empleo clínico.

Un biomaterial idóneo para la sustitución ósea debe ser osteoconductor, para lo cual necesita proporcionar un armazón apto para guiar los fenómenos óseos reparativos; estructuralmente resistente, para aportar de acuerdo con su formulación específica el mejor soporte biomecánico hasta su reemplazo por el tejido óseo neoformado; y biorreabsorbible, es decir, capaz de ser degradado progresivamente sin generar productos tóxicos [3;8].

## **I.2. Clasificación de los biomateriales**

### **I.2.1. Según el tipo de respuesta del organismo**

Teniendo en cuenta las características de la respuesta que generan en el tejido circundante, los biomateriales cerámicos se pueden clasificar en tres grandes grupos: inertes, bioactivos y reabsorbibles.

#### *Inertes*

Estos biomateriales tradicionales aún dominan la mayor parte del mercado comercial de los biomateriales (por ejemplo el titanio en todas sus aleaciones, la alúmina y los polímeros termoplásticos). En estos materiales el cuerpo se tiene que ajustar al material, y en muchos casos esto no ocurre, formándose así un tejido fibroso que aísla el implante del tejido vivo [2]. No hay reacción química intensa dentro del ambiente del cuerpo, lo que hay es una ausencia de corrosión de estos materiales. Esto deja de cumplir las exigencias de las demandas de la generación moderna de biomateriales. Estas demandas son: una interacción biológica (biomaterial-entorno) controlada en un número de formas tales como la regulación de los procesos biológicos y la degradación de los materiales dentro del sistema biológico, o combatir las infecciones y disminuir los tiempos de recuperación [3].

#### *Bioactivos*

Son materiales complejos con alguna similitud al material a sustituir en el sistema biológico, por ejemplo la composición. Tienen propiedades osteoconductivas y se unen directamente con el hueso vivo sin formación de tejido fibroso. Sin embargo, sus propiedades mecánicas son, en general, inferiores a las de las cerámicas bioinertes.

En la mitad de los años 80 se comenzaron a emplear los materiales bioactivos en aplicaciones ortopédicas y dentales, entre ellos se encuentran diferentes composiciones de vidrio, cerámica, vitrocerámicas y materiales compuestos. Uno de los materiales cerámicos bioactivos más usados es la hidroxiapatita (HA) que se utiliza en forma de implante poroso, en polvo, o como recubrimiento de prótesis metálicas, con el fin de proporcionar una fijación bioactiva [6;7;9-11]. La presencia de una HA moderadamente soluble lleva a una respuesta, en términos de osteoconducción, en la que el hueso crece a lo largo del recubrimiento formando una interfaz mecánicamente fuerte.

Otro ejemplo de estos biomateriales son los biovidrios, que hoy en día tienen una cuota significativa del mercado de los biomateriales [2]. La característica principal de los vidrios

y los vitrocerámicos es su bioactividad, que implica la capacidad de estos materiales de unirse al hueso mediante la formación de una capa de carbohidroxiapatita (CHA), similar a la de fase mineral del hueso, que es responsable de esta fuerte unión, (véase sección I.3 para más detalle) [7;12-18].

### *Reabsorbibles*

Una vez implantados estos materiales son reabsorbidos o progresivamente reemplazados por tejido óseo neoformado. Para ello debe existir una adecuada correlación entre las velocidades de reabsorción del biomaterial y de regeneración del hueso. Entre estos se encuentran las placas de fijación y los tornillos usados en cirugía ortopédica, y materiales para la liberación controlada de fármacos. También se encuentran dentro de este grupo los cementos de fosfatos de calcio [2].

## **I.2.2.Según sus características físico-químicas**

Considerando sus características físico-químicas los biomateriales se pueden clasificar en los siguientes grupos generales: metálicos, poliméricos, cerámicos y compuestos [7;19-22].

### *Metálicos*

Entre los metales típicos usados como biomateriales se encuentran los aceros inoxidables, las aleaciones de hierro con Cr-Ni-Mo, aleaciones de cobalto (Co-Cr-Mo, Co-Cr-W-Ni y Co-Ni-Cr-Mo) y el titanio puro o como aleación ( $\text{TiAl}_6\text{V}_4$ ), siendo este último el más usado y con más éxito como biomaterial metálico. Las razones de este éxito radican en la estabilidad de la capa de óxido de titanio, la resistencia a la corrosión en condiciones fisiológicas, y una baja osteopenia en contacto con el hueso y una buena interacción celular [2].

Debido a su resistencia mecánica, es que los biomateriales metálicos son especialmente adecuados en aplicaciones en las que debe soportar carga. Para mejorar la resistencia a la corrosión, estos materiales se recubren, antes de ser utilizados, con una capa de óxido; llamada capa de pasivación. Además, la superficie del biomaterial metálico, debe ser estable a lo largo del período de uso en el ambiente biológico. Bajo esfuerzos de carga mecánica, la capa de óxido puede dañarse, en consecuencia, los productos de corrosión y/o las partículas del implante pueden ser liberados, lo que puede ser citotóxico o puede producir efectos adversos en la función de los osteoblastos [2].

### *Poliméricos*

Los polímeros constan mayoritariamente de componentes orgánicos y con respecto a sus propiedades macromoleculares son comparables con los principales componentes funcionales del ambiente biológico: los lípidos, las proteínas y los polisacáridos. Entre otras ventajas de los materiales poliméricos se encuentran un procesamiento sencillo y un amplio rango de áreas de aplicación en el cuerpo humano. Esto se explica por el extenso rango de materiales poliméricos disponibles. El más comúnmente usado es el polietileno (PE) y sus diferentes modificaciones, tales como: el de baja densidad (etileno) (LDPE), de alta densidad (HDPE) y el de ultra alto peso molecular (UHMWPE). Los sistemas de liberación de fármacos están basados frecuentemente en polímeros degradables como polilactidos (PLA), poliglicoles (PGA), poli(lactido-co-glicolidos) (PLGA), polianhídridos y poliortoésteres [23].

Recientemente, los polímeros biológicos como el quitosano o el colágeno son utilizados en un amplio rango de aplicaciones biomédicas. Esto se debe a su biodegradabilidad y diseño molecular, el cual es similar o idéntico a las moléculas presentes en el cuerpo [24].

Aunque estos polímeros tienen muchas ventajas, una de las desventajas más importantes de alguno de ellos se encuentra en la variación de su calidad y pureza, como por ejemplo el quitosano [2].

Debido a su relativo bajo módulo de Young, los polímeros, por lo general, no pueden ser utilizados en aplicaciones en las que deben soportar carga. Las propiedades mecánicas de los biomateriales poliméricos dependen del peso molecular que se haya utilizado en su producción, del peso molecular del polímero y cual súper-estructura (morfología) presenta el polímero. Sin embargo, los polímeros son usados algunas veces en aplicaciones en las que deben soportar carga como por ejemplo en la copa acetabular de UHMWPE. La principal razón de este comportamiento es la buena propiedad de fricción cuando el UHMWPE es combinado con cabezas acetabulares metálicas en las prótesis de articulación de caderas. En este caso la estabilidad mecánica del UHMWPE se debe al alto peso molecular del polímero que conduce a la formación parcial de cristales en el polímero o al entrecruzamiento de las cadenas de polímeros[7;10;23;25].

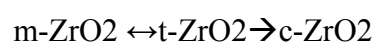
Los problemas de los biomateriales poliméricos se encuentran en el área de la esterilización, realizarla sin cambiar las propiedades de los polímeros es un reto, ya que se produce una expansión debido a la adsorción de agua produciendo cambios en el volumen

de los biomateriales poliméricos [23]. Otro reto para los materiales poliméricos radica en su degradación en ambiente biológico, por ejemplo los poliestirenos tienden a degradarse cuando son expuestos al agua, resultando en la formación de oligómeros, los cuales estimulan la inflamación en el cuerpo [25]. Por otro lado, las enzimas tales como la esterasa y papaina degradan al PE [20].

### *Cerámicas*

Los biomateriales cerámicos más comúnmente usados son la alúmina ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), la circona ( $\text{ZrO}_2$ ), los fosfatos de calcio, los vidrios bioactivos, los vitrocerámicos y el carbón. La alúmina y la circona se usan como componentes en prótesis de unión total (cabezas femorales de los implantes de cadera, y rodilla) y en implantes dentales. Su popularidad se basa en su respuesta bioinerte, su alta resistencia al desgaste, su elevada resistencia a la flexión y su relativa baja fricción. La principal aplicación de la alúmina está en las cabezas femorales y codos. Estos dispositivos de  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  policristalina, se fabrican por prensado isostático de polvos submicrométricos a elevadas temperaturas (prensado isostático en caliente, HIP siglas en inglés). El desgaste de las articulaciones en la superficie  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-Al}_2\text{O}_3$  es más bajo que el de la interfaz UHMWPE-metal, lo que origina un ciclo de trabajo relativamente largo para estos implantes [26;27].

La circona es un óxido que presenta cambios polimórficos, cristaliza con diferentes estructuras cristalinas –monoclínica (m), cúbica (c) y tetragonal (t)- que son estables en diferentes rangos de temperatura.



La transformación monoclínica-tetragonal, que implica un cambio de volumen entre el 3-5 %, es de tipo martensítico y tiene lugar a  $\sim 1100^\circ\text{C}$  durante el calentamiento y a  $\sim 850^\circ\text{C}$  durante el enfriamiento [27].

El cambio de volumen asociado a la transformación  $\text{t} \rightarrow \text{m}$ , que tiene lugar durante el enfriamiento de la circona pura policristalina sinterizada, produce grietas que hacen al material inadecuado para aplicaciones en las que deba trabajar bajo carga.

Los materiales de circona con 3 moles % de  $\text{Y}_2\text{O}_3$  (itria) en solución sólida, sinterizados con un ciclo térmico adecuado, presentan una microestructura homogénea formada por cristales nanométricos de circona tetragonal ( $\text{Zr}_{1-x}\text{Y}_x\text{O}_2$ , retenida metaestablemente), ya que la temperatura de transformación de la circona con itria en solución sólida es tan baja

(~500°C) que la velocidad de transformación es muy lenta, por lo que se puede retener la fase tetragonal en forma metaestable (eutectoide del sistema  $\text{ZrO}_2\text{-Y}_2\text{O}_3$ ). Así pues, la circonita tetragonal policristalina presenta excelentes propiedades mecánicas (módulo elástico  $E = 207 \text{ GPa}$ ; módulo de rotura  $\text{MOR} = 100\text{-}650 \text{ MPa}$ ; tenacidad  $K_{\text{IC}} = 7\text{-}8 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ ). En estos materiales los esfuerzos producidos por la transformación de  $t$  a  $m$  dan lugar a esfuerzos de compresión cerca de las puntas de la grieta que tienden a cerrar las grietas formadas, interrumpiendo así su crecimiento (reforzamiento por transformación) [7;10;21;26-29].

Otros materiales cerámicos usados como biomateriales son los fosfatos de calcio (CaP), generalmente del tipo ortofosfatos de calcio. Esto implica que el fosfato está en la estructura de estos materiales formando grupos ortofosfato  $[\text{PO}_4^{3-}]$ . Dependiendo del método de preparación es posible distinguir entre CaP de baja temperatura (preparados por vía química solución-precipitación) o de alta temperatura (obtenidos mediante tratamiento térmico a temperaturas superiores a  $1125^\circ\text{C}$ ). Uno de los CaP más usados como biomaterial es la apatita, debido a que es el componente mayoritario del hueso y los dientes por lo que los biomateriales de apatita se pueden utilizar en contacto con tejido mineralizado del cuerpo humano [4;28-33].

Las apatitas son compuestos de fórmula  $\text{A}_{10}(\text{BO}_4)_6\text{C}_2$ , siendo el más destacado la HA [4]. La HA es utilizada por ejemplo como recubrimiento de aleaciones de titanio para implantes de soporte de carga ortopédicos, promoviendo la formación de una fuerte unión entre el tejido del hueso mineralizado y el implante en cortos períodos de tiempo. Aunque la HA es descrita algunas veces por ser un componente del hueso y de los dientes, la apatita del hueso es no-estequiométrica, es decir contiene otros componentes adicionales tales como carbono, magnesio, flúor u otros, lo que reduce su cristalinidad, comparada con la HA estequiométrica, por otro lado la presencia de impurezas puede influir en su solubilidad. Además, la solubilidad de los biomateriales de CaP es un tema importante ya que depende del valor del pH del entorno, de la superficie específica del compuesto, del grado de cristalinidad y del contenido de impurezas. El fosfato tricálcico (TCP) es mucho más soluble que la HA, y su principal aplicación actualmente se centra en el diseño de cementos óseos y materiales para relleno en zonas en las que las propiedades mecánicas no son importantes [2;7;10].

Por otro lado el fosfato tricálcico tiene tres fases polimórficas,  $\beta$ ,  $\alpha$  y  $\alpha'$ . La fase  $\beta$  se transforma de forma irreversible en la fase  $\alpha$  a  $T > 1125^\circ\text{C}$  y el  $\alpha$ -TCP transforma en  $\alpha'$  a



$T > 1450^{\circ}\text{C}$ . Adicionalmente, los dos poliformos de baja temperatura del TCP tienen coeficientes de dilatación fuertemente anisótropos. Los mencionados cambios de volumen y la anisotropía en la dilatación de ambos polimorfos explican las propiedades mecánicas poco satisfactorias de los compactos de TCP en el mercado, lo que hace que estos materiales no sean adecuados en aplicaciones de carga [2].

Otro grupo de biomateriales cerámicos son los vidrios y las vitrocerámicas que contienen  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaO}$ ,  $\text{P}_2\text{O}_5$  y/o  $\text{Na}_2\text{O}$ . Estos se obtienen mediante el proceso habitual de fabricación de vidrio que incluye fusión y colado pero necesitan materias primas de alta pureza [15;16].

### *Compuestos*

Los compuestos (composites, en inglés) se basan en la combinación de al menos dos materiales diferentes, donde uno actúa como matriz (fase continua) que suele ser un polímero, y otro actúa como relleno que puede ser un material cerámico en polvo (fase dispersa). Esto permite que las propiedades del material compuesto sean mejores que las de la matriz. Entre las mejoras se encuentran un aumento de las propiedades mecánicas, estabilidad a la erosión, o dotar al material de propiedades interesantes como radiopacidad o liberación controlada de los compuestos bioactivos. La polimerización de la matriz de resina puede llevarse a cabo *in vivo* como en el caso de los compuestos dentales y cementos óseos. Sobre la base de este proceso de reacción los monómeros residuales pueden irritar y dañar los tejidos circundantes. Otros materiales compuestos son los reforzados con fibras, estos compuestos no presentan un papel importante en la práctica clínica actual debido a la relativa baja escala de producción de estos implantes, a la complejidad del proceso de fabricación y/o el alto costo de producción [24;34;35].

### **I.2.3.Según su evolución**

La clasificación de los biomateriales según su evolución se basa en la complejidad y en la habilidad que estos tienen para ajustarse y/o interactuar con el ambiente biológico del cuerpo.

#### *Primera generación*

Inicialmente, los biomateriales usados en el cuerpo se basaban en materiales ya existentes en áreas como la aeronáutica [2;36]. Sólo se buscaba lograr una combinación adecuada de

las propiedades físicas del biomaterial con los del tejido duro a reemplazar, y que tuviera una reacción tóxica mínima. En esta clasificación entrarían los materiales con una respuesta inerte del organismo, los cuales se han descrito anteriormente (véase sección I.2.1).

### *Segunda generación*

El campo de los biomateriales comenzó a cambiar, buscando desarrollar materiales que controlasen la acción y reacción en el entorno fisiológico. En este grupo se encuentran los materiales bioactivos, que como se verá en la sección I.4, el mecanismo de unión con el hueso de estos materiales tiene lugar mediante una secuencia de pasos. Los primeros cinco pasos ocurren sobre la superficie del material y envuelven intercambios entre los iones del biomaterial y los del medio fisiológico, seguida de una reacción de policondensación del silicio superficial lo que genera grupos silanoles, que proporcionan un número elevado de sitios para la nucleación heterogénea de la capa de carbohidroxiapatita (CHA) biológica equivalente a la fase mineral inorgánica del hueso. Esta capa de CHA formada sobre la superficie del material proporciona un ambiente ideal para que ocurran los diferentes pasos de reacción celular que incluyen la colonización por osteoblastos (las células que producen hueso), seguido de la proliferación y diferenciación de las células que forman nuevo hueso con una buena unión a la superficie del implante, lo que da lugar a una fuerte unión implante-hueso neoformado [16;27;36]. En esta clasificación se encuentran los materiales bioactivos explicados en la sección I.2.1.

En esta generación también se encuentran los biomateriales reabsorbibles los cuales, como ya se ha discutido en la sección I.2.1, exhiben una velocidad de disolución en suero fisiológico que puede ser más elevada que la formación de nuevo hueso lo que origina una alta reabsorción. De esta forma, los problemas de interfaz desaparecen, debido a que el implante es sustituido por nuevo hueso, y después de un tiempo no existen diferencias perceptibles entre la zona implantada y la zona receptora.

### *Tercera generación*

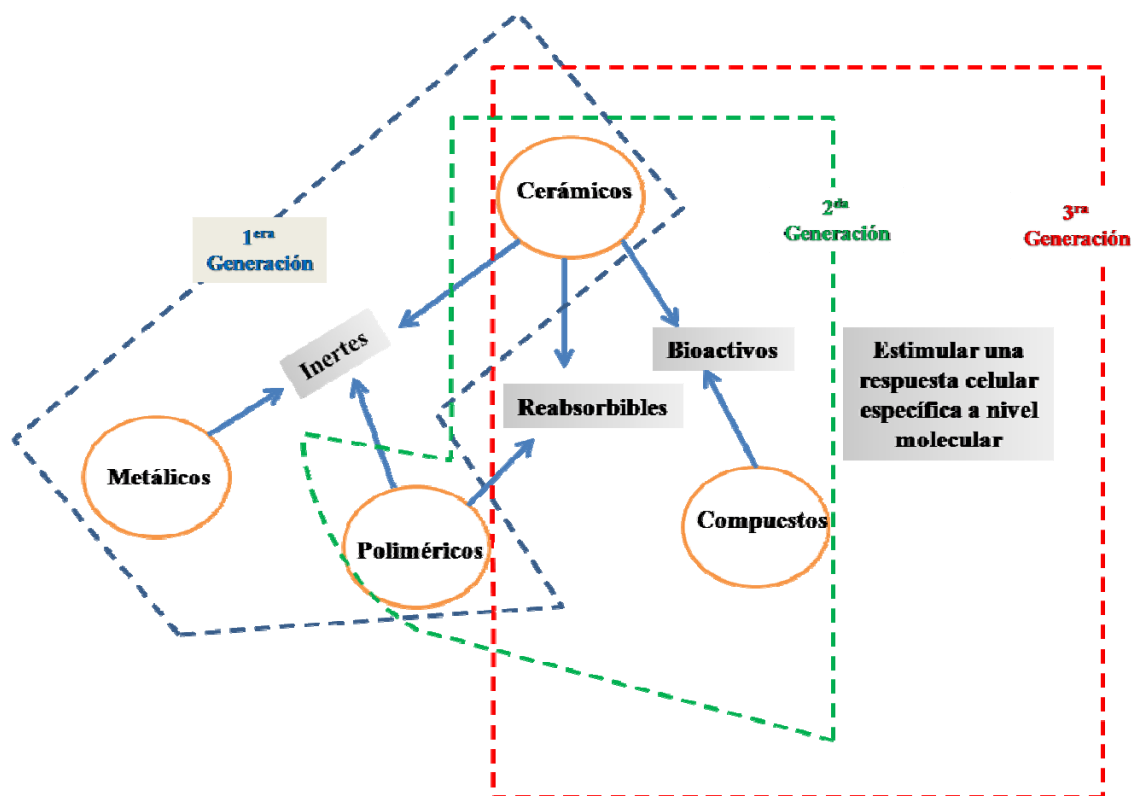
Los biomateriales de tercera generación han sido diseñados para estimular una respuesta celular específica a nivel molecular. Los conceptos separados de materiales bioactivos y materiales reabsorbibles convergen dando lugar a que los materiales bioactivos se hacen reabsorbibles y viceversa. La tercera generación de vidrios bioactivos y esponjas macroporosas se ha diseñado para activar los genes que estimulan la regeneración del

tejido vivo. Hasta el momento existen dos alternativas para diseñar estos biomateriales: la ingeniería de tejidos y la regeneración de tejido *in situ* [2;36].

La ingeniería de tejidos consiste en la siembra de células progenitoras sobre una esponja reabsorbible. Las células crecen dentro de esta estructura, fuera del cuerpo humano, llevando así a la diferenciación y formación de un tejido que imita al natural. Este tejido ingenieril luego es implantado en el paciente para reemplazar tejido muerto o dañado. Con el tiempo la esponja es reabsorbida y reemplazada por tejido del huésped que incluye conductos sanguíneos y nervios. Los materiales desarrollados mediante la ingeniería de tejidos pueden ser materiales biomiméticos (que contienen un diseño y una estructura similar a los presentes en el cuerpo) [2;36].

Por otro lado, la regeneración de tejido *in situ* envuelve el uso de biomateriales en forma de polvo, soluciones o micropartículas dopadas para estimular la reparación local del tejido. Los materiales bioactivos en contacto con el suero fisiológico se disuelven a una velocidad controlada y liberan iones ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{SiO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_4\text{H}^{2-}$ , otros) que junto con factores de crecimiento como la proteína morfogénica ósea (BMP), mediante difusión o ruptura de enlaces, activan las células en contacto con el estímulo. Las células producen factores adicionales de crecimiento, que a su vez estimulan múltiples generaciones de células en crecimiento que se auto-ensamblan para formar los tejidos necesarios *in situ* mediante la bioquímica y la biomecánica. Por ejemplo, cuando el vidrio en polvo se usa como relleno de defectos óseos existe una rápida regeneración ósea [2;36].

La figura 1.1 muestra la relación entre todas las clasificaciones de los biomateriales presentadas en este capítulo. Se puede observar que desarrollar materiales de tercera generación no implica dejar de usar los ya existentes, hay que trabajar sobre ellos para lograr convertirlos de tercera generación.



**Figura 1.1.** Relación entre las diferentes clasificaciones, según el tipo de respuestas del organismo, según sus características físico-químicas y según su evolución.

### I.3. Materiales vítreos y vitrocerámicos bioactivos

Como se ha observado en la clasificación de los biomateriales según el tipo de respuesta del organismo (véase sección I.2.1), los materiales bioactivos presentan la propiedad que les permite una adhesión directa al hueso, sin formación de tejido fibroso.

Entre los materiales que presentan esta característica se encuentran algunos vidrios y vitrocerámicas. Los vidrios bioactivos tienen un rol central en el campo de la regeneración ósea, debido a su excelente bioactividad y osteoconductividad [35].

Entre sus usos se encuentra la fabricación de prótesis de oído medio utilizadas para restaurar los huesecillos de la cadena osicular y tratar la pérdida de la audición conductiva, y como implante oral para preservar la cresta alveolar que se reabsorbe cuando un diente es extraído [15;16].

### I.3.1. Vidrios bioactivos

El primer vidrio bioactivo, Bioglass<sup>®</sup>, fue desarrollado por Hench y col en 1971 [7]. Para su desarrollo se basaron en el sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$ . Hasta el momento es el vidrio bioactivo mas estudiado. A partir del Bioglass<sup>®</sup>, Hench y col. han desarrollado y caracterizado un amplio rango de vidrios basados en el sistema cuaternario antes mencionado, Tabla I.1, todos presentan un 6 % en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$  [7;16].

**Tabla I.1.**

*Porcentaje en peso de los óxidos presentes en los diferentes vidrios desarrollados por Hench y col. Todos los vidrios contienen 6% en peso de  $\text{P}_2\text{O}_5$ .*

Biovidrios	$\text{SiO}_2$	$\text{CaO}$	$\text{Na}_2\text{O}$	$\text{B}_2\text{O}_3$	$\text{F}_2\text{Ca}$	$\text{K}_2\text{O}$
<b>45S5 (Bioglass<sup>®</sup>)</b>	45	24,5	24,5			
<b>45S5F</b>	43	12	23		16	
<b>45B15S5</b>	30	24,5	24,5	15		
<b>45B5S5</b>	40	24,5	24,5	5		
<b>KCP1</b>	45	24,5				24,5
<b>45S5-N</b>	50	24,5	19,5			
<b>45S5-C</b>	50	19,5	24,5			

La presencia de  $\text{P}_2\text{O}_5$  en la composición de los vidrios bioactivos fue inicialmente considerada esencial, pero Li y col. [37] demostraron que vidrios del sistema  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O}$  libres de iones fosfato eran bioactivos. Igualmente, Ohura y col. [18] obtuvieron un vidrio binario de silicato de calcio, llamado CS, conteniendo 48,3% en peso de  $\text{CaO}$  y 51,7 % en peso de  $\text{SiO}_2$  el cual presentó *in vivo* una unión fuerte con el tejido óseo. Por lo tanto, todos de los vidrios que son capaces de unirse al tejido vivo contienen silicatos y la mayoría fosfatos.

Los vidrios bioactivos pueden clasificarse en dos grandes grupos: (1) ricos en álcalis (ej. los vidrios desarrollados por Hench y col.), los cuales contiene más del 20% en peso de óxidos alcalinos, o (2) pobres en álcalis, con menos del 5% en peso de óxidos alcalinos [16].

### *Preparación de vidrios bioactivos*

Los vidrios bioactivos se preparan, utilizando materias primas de alta pureza ya que la calidad de éstas influye en el producto final. Entre estos materiales se encuentran el cuarzo altamente puro o arena de sílice, carbonatos de sodio o potasio de grado reactivo, y fosfatos de calcio. Estas materias primas se mezclan y funden generalmente en un crisol de Pt o Pt/Rh y se cuecen sobre placas de latón o de grafito, que no contaminan al vidrio ya que éste no se adhiere a ellos. Posteriormente, se realiza un proceso de recocido con el fin de eliminar las tensiones residuales presentes en el vidrio después del colado (enfriamiento rápido del fundido).

Otro método de obtención de vidrios es el método sol-gel, el cual consta de una serie de procesos que implican reacciones entre sales orgánicas o inorgánicas a temperaturas inferiores a 100°C seguidas de tratamientos térmicos a  $T > 500^{\circ}\text{C}$  para eliminar los distintos disolventes utilizados en la reacción.

### **I.3.2. Vitrocerámicos bioactivos**

Un vitrocerámico es un material que ha sido obtenido mediante un tratamiento térmico al vidrio en dos etapas que dan lugar, primero a la nucleación y posteriormente al crecimiento de fases cristalinas específicas en el vidrio, originando un material policristalino con una cantidad significativa de vidrio residual [38].

La mayoría de los vitrocerámicos se basan en composiciones similares a los vidrios bioactivos de Hench (Bioglass®), sin embargo presentan un bajo contenido de óxidos alcalinos. En la tabla I.2 se resumen los vitrocerámicos actualmente utilizados en el campo clínico y se comparan con el Bioglass® 45S5.

#### *Ceravital®*

El primer vitrocerámico empleado en el campo clínico, conocido como Ceravital®, fue desarrollado por Brömer y Pfeil en 1973. Fue diseñado con la intención de ser usado como sustituto óseo en zonas de carga y en dientes, pero como se puede observar en la tabla I.2, las propiedades mecánicas que presenta están por debajo de 160MPa que corresponde al hueso cortical humano y es similar a la hidroxiapatita densa (115 MPa). Su uso actual se centra en la sustitución de la cadena osicular del oído medio, donde las cargas son mínimas [39].

**Tabla I.2.**

*Composición en óxido de los vitrocerámicos usados en el campo clínico y algunas propiedades mecánicas. Con fines comparativos se muestran los valores para el Bioglass® [38-43].*

	Composición en porcentaje en peso								Propiedades Mecánicas	
	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	MgO	CaO	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	CaF <sub>2</sub>	MOR* (MPa)	E** (GPa)
<b>Bioglass®</b>	24,5	0	0	24,5	0	45,0	6	0	42	35
<b>Ceravital®</b>	5-10	0,5-0,3	2,5-5	30-35	0	40-50	10-50	0	100-150	n.r
<b>Cerabone®</b>	0	0	4,6	44,7	0	34,0	6,2	0,5	220	117
<b>Ilmaplant®</b>	4,6	0,2	2,8	31,9	0	44,3	11,2	5,0	170	n.r
<b>Bioverit®</b>	3-8	0	2-21	10-34	8-15	19-54	2-10	3-23	100-160	70-88

\*MOR: modulo de rotura o resistencia a la flexión

\*\*E: modulo de Young

### *Cerabone®A/W*

Uno de los vitrocerámicos bioactivos con mayor éxito clínico, es probablemente el denominado Cerabone®A/W que fue desarrollado por Kokubo y col. [41;44-46], este material presenta dos fases cristalinas: oxifluorapatita y wollastonita-2M y una fase vítrea/amorfa residual. La composición se muestra en la tabla I.2.

El cerabone®A/W se obtiene mediante sinterización-cristalización de compactos obtenidos por prensado isostático a 200MPa de polvo de vidrio (~5 µm). Los compactos se someten a un tratamiento térmico en dos etapas: primero un estadio de nucleación a 830°C seguido de un proceso de cristalización a 900°C, que resulta en la precipitación de oxiapatita y wollastonita, respectivamente. El producto final es un vitrocerámico con buenas propiedades mecánicas, véase tabla I.2, debidas a una microestructura fina y homogénea.

### *Ilmaplant-LI®*

Berger y col. [39] han desarrollado este vitrocerámico desde un vidrio en masa, el cual presenta dos fases cristalinas (apatita y wollastonita). Como se puede observar en la tabla I.2, este se diferencia del Cerabone® en un mayor contenido de CaF<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub> y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>; y menor contenido de CaO. Esto produce un bajo módulo de resistencia a la flexión (véase tabla I.2), su uso se limita a implantes maxilofaciales.

*Bioverit<sup>®</sup>*

Holand y col. [39], desarrollaron una serie de vitrocerámicos que se muestran en la tabla 1.2, llamado Bioverit<sup>®</sup>. Este material puede ser mecanizado con herramientas estándar y retocado en la sala de operaciones. Estos materiales se obtienen a partir de un vidrio de sílico-fosfato con una composición compleja dentro del sistema:  $\text{SiO}_2\text{-Al}_2\text{O}_3\text{-MgO-Na}_2\text{O-K}_2\text{O-F-CaO-P}_2\text{O}_5$ . El procedimiento implica un estadio de nucleación seguido de otro de crecimiento, tratamientos térmicos a 610°C y 1050°C, respectivamente. El producto resultante consta de un vidrio residual, una mezcla de cristales de apatita (1 - 2µm en tamaño) y una mica de tipo fluoroflogopita,  $\text{Na/KMg}_3(\text{AlSi}_3\text{O}_{10}\text{F}_2)$ , que facilita el mecanizado del material.

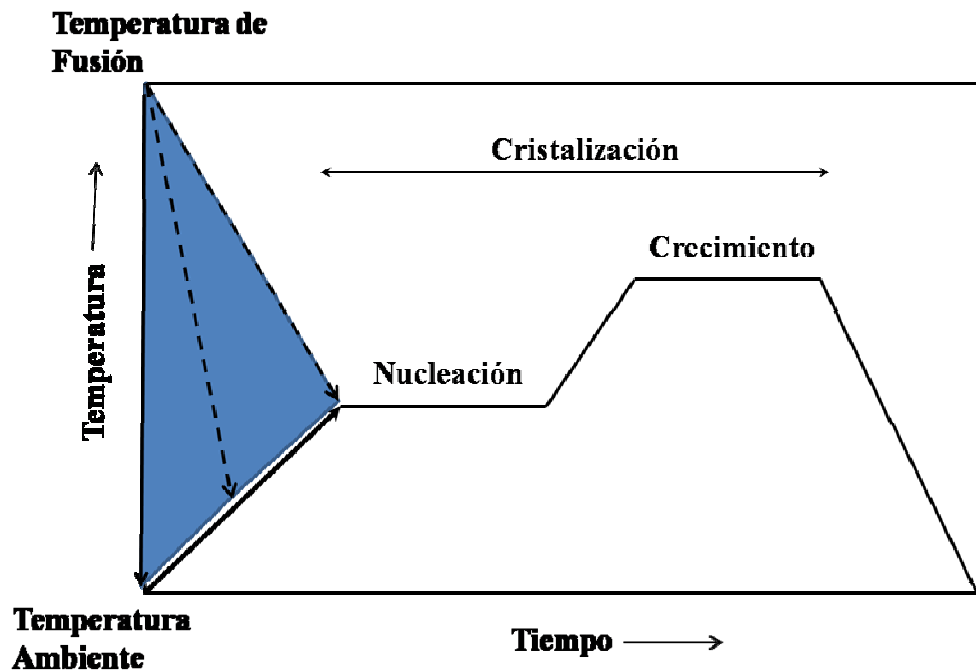
*Preparación de vitrocerámicos bioactivos*

El interés de los materiales vitrocerámicos en el campo biomédico, se centra en dos ventajas interesantes. Una de ellas es que estos materiales pueden ser obtenidos en formas altamente complejas, ya que el primer paso del procedimiento implica la producción de un vidrio que puede fabricarse utilizando técnicas bien conocidas y económicas, que incluyen fundido, soplado, presión o laminado. Otra ventaja radica en que debido a la cristalización secuencial del vidrio, los vitrocerámicos poseen una microestructura muy fina (puede ser nanométrica), que contiene pocos o ningún poro, lo que produce una mejora en las propiedades mecánicas del producto final respecto del vidrio original.

La obtención de vitrocerámicos implica dos etapas: a) nucleación y b) crecimiento de las fases cristalinas, como se esquematiza en la figura 1.2. Primero, el vidrio obtenido a temperatura ambiente es calentado hasta la temperatura de nucleación óptima. Alternativamente, el vidrio puede ser llevado a la temperatura de nucleación, después de su obtención, sin necesidad de enfriar hasta temperatura ambiente, como se muestran en las líneas discontinuas de la figura 1.2. El siguiente paso es crítico, la temperatura debe aumentarse lentamente, por lo general a velocidades menores a 5°C min<sup>-1</sup> con el fin de evitar esfuerzos debido a los cambios de volumen durante la cristalización, lo que provoca grietas o fractura del material. El calentamiento lento permite suprimir estas tensiones mediante procesos del flujo viscoso en el vidrio residual, el material aumenta su rigidez cuando la fracción de fase cristalina aumenta. Después de alcanzar la temperatura de crecimiento, ésta se mantiene durante el tiempo requerido para alcanzar el grado de



cristalinidad deseado. Finalmente, el vitrocerámico es enfriado hasta temperatura ambiente [38;39;43].



**Figura 1.2.** Esquema simplificado de las etapas de tratamiento térmico usadas generalmente, para obtener un vitrocerámico.

Dependiendo de la composición química del vidrio, la cristalización puede iniciarse en la superficie, lo que genera un material con una microestructura heterogénea y con baja resistencia mecánica.

Para obviar este inconveniente se recurre a la obtención de vitrocerámicos mediante procesos de sinterización-cristalización controlada de polvo de vidrio.

Otra alternativa es el uso de aditivos como agentes nucleantes, para asegurar la nucleación en volumen y la obtención de una microestructura adecuada. Entre los aditivos más usuales se encuentran partículas metálicas (Cu, Ag, Au, Pt) u óxidos metálicos ( $\text{SnO}_2$ ,  $\text{Ce}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ). En el campo de los vitrocerámicos para aplicaciones biomédicas, el  $\text{P}_2\text{O}_5$  tiene las mismas propiedades nucleantes que el  $\text{TiO}_2$  [38;39;43].

## **I.4. Bioactividad. Ensayos *in vitro***

En el presente trabajo se entenderá como Bioactividad a la capacidad que tiene un biomaterial de unirse espontáneamente al tejido óseo sin la formación de tejido fibroso circundante. Como se ha mencionado anteriormente (véase sección I.2), entre los materiales bioactivos se encuentran la hidroxiapatita, el  $\beta$ -TCP, vidrios de silicatos y de sílico fosfatos y vitrocerámicos con apatita y wollastonita.

En los primeros años de estudio de los biomateriales, para determinar la bioactividad se recurría a los ensayos *in vivo* con animales de experimentación. En 1991, Kokubo y col. [40] establecieron que para que un biomaterial se uniera al tejido óseo era esencial la formación de una capa de apatita sobre la superficie del mismo cuando era implantado, y establecieron que esta formación de apatita *in vivo* puede ser reproducida en Suero Fisiológico Artificial (SFA) con una concentración de iones igual a la del plasma humano. Esto quiere decir que la bioactividad de un material puede predecirse mediante la formación de una capa de apatita sobre su superficie en SFA.

### **I.4.1. Ensayos en Suero Fisiológico Artificial (SFA)**

En 1980, Hench y col. [47] mostraron que se forma una capa de  $\text{SiO}_2$  y fosfato de calcio sobre la superficie del Bioglass<sup>®</sup> cuando se implanta en el cuerpo, estas capas permiten al implante unirse al tejido vivo. Estos autores fueron los primeros en reproducir un comportamiento bioactivo del material *in vivo* en una solución, en este caso era una solución buffer que consiste en Tris hidroximetil-aminometano y ácido clorhídrico (solución Tris buffer) a un pH de 7,4.

Kisigui y col. [48] encontraron que la capa rica en  $\text{SiO}_2$  no se formaba sobre el Cerabone<sup>®</sup> cuando era implantado en el tejido vivo, pero se formaba una capa de fósforo y calcio sobre la superficie del mismo que permitía su unión al tejido vivo. Esta capa fue identificada por Kokubo y col. [49], mediante micro-difracción de rayos X, como apatita cristalina. En 1990, ellos establecieron que la formación de la capa de apatita *in vivo* sobre la superficie del Cerabone<sup>®</sup> puede reproducirse en una solución acelular como el SFA, con una concentración de iones cercana a la del plasma de sangre humana, pero no podía ser obtenida usando la solución Tris buffer establecida por Hench y col. [46;50]. Mediante diferentes técnicas de caracterización (DRX, IR, MEB y MET) demostraron que la apatita formada en el SFA presenta una gran similitud en composición y estructura con la HA

mineral del hueso [46;50;51]. También han estudiado un vitrocerámico conteniendo las mismas fases cristalinas que el Cerabone<sup>®</sup> pero en una matriz que contiene Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, y han encontrado que no se une al tejido óseo y no se forma la capa de apatita sobre la superficie, ni *in vivo*, ni en SFA [46;52]. Basados en estos resultados fue que en 1991 Kokubo y col. [40], establecieron que un requerimiento esencial, para que un material se una al tejido vivo, es la formación de la capa de apatita sobre la superficie del mismo y que este comportamiento se puede reproducir en SFA. Es por esto que la bioactividad *in vivo* de un material se puede predecir mediante el estudio de la formación de la capa de apatita sobre su superficie en SFA.

Desde que se establecieron, los ensayos en SFA para predecir la bioactividad de los biomateriales *in vivo*, hasta ahora, la concentración iónica del mismo ha cambiado con el fin de que su concentración de iones sea lo más parecida a la del plasma de sangre humano. De cualquier forma, en la presente investigación se ha usado el aprobado por el Comité Técnico de la Organización Internacional de Normas (ISO-TC, siglas en inglés) para evaluar la habilidad que tienen los biomateriales para formar apatita [17].

Estudios *in vivo* e *in vitro* en SFA de diferentes materiales han permitido correlación los resultados de los dos estudios, ya que materiales que presentan una calcificación *in vivo* en su superficie también presentan una calcificación en SFA, entiéndase por calcificación la formación de la capa de apatita. Entre los materiales en los que se ha encontrado esta correlación están los vidrios del sistema Na<sub>2</sub>O-CaO-SiO<sub>2</sub>, el vitrocerámico Cerabone<sup>®</sup>, el vitrocerámico Ceravital<sup>®</sup>, el vidrio Bioglass<sup>®</sup>, la hidroxiapatita sinterizada y los metales como el titanio tratado térmicamente con álcalis. Es importante aclarar que materiales que no formen apatita en su superficie *in vivo* no indica que no puedan unirse al tejido vivo. Por ejemplo, materiales reabsorbibles como el  $\beta$ -TCP y el carbonato de calcio se unen al tejido vivo sin formación de la capa de apatita sobre su superficie. Pero, la mayoría de materiales que forman la capa de HA se unen al tejido duro *in vivo* [17].

#### **I.4.2.Mecanismos de formación de hidroxiapatita (HA) en la superficie del biomaterial.**

Hench y col [21] han establecido que el mecanismo general de formación de HA en la superficie de un vidrio en un ambiente inorgánico ocurre en cinco pasos:

- (i) Rápido intercambio de iones alcalinos y alcalinotérreos con protones de la solución.
- (ii) Liberación al SFA de sílice soluble en forma de  $\text{Si(OH)}_4$ .
- (iii) Condensación y repólimerización de una capa rica en Si sobre la superficie del vitrocerámico empobrecida en alcalinos y alcalinotérreos.
- (iv) Migración de grupos  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{PO}_4^{3-}/\text{HPO}_4^{2-}$  a la superficie a través de la capa rica en Si formando una capa amorfa de fosfato de calcio sobre la capa de Si, seguida del crecimiento de la capa de fosfato de calcio, mediante la incorporación de calcio y fósforo soluble de la solución.
- (v) Cristalización de la capa amorfa de fosfato de calcio mediante la incorporación de aniones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  o  $\text{F}^-$  desde la solución a la capa de hidroxi/carbón/fluorapatita.

Diferentes investigaciones han mostrado que la capa intermedia de sílice no es esencial para la cristalización de una capa de HA, ya que vidrios sin esta capa de sílice han formado una capa de HA al estar inmersos en SFA. Algunos estudios sugieren que este comportamiento se debe a que la etapa de condensación y repólimerización de la capa rica en  $\text{SiO}_2$  y la etapa de formación de la capa de HA son procesos competitivos [12;13;21].

Aguiar y col [12], explican que en los vidrios que contienen fósforo pueden existir nano-regiones de fosfatos que actúan como lugares de nucleación de la capa de HA. Esto puede explicar la razón por la que vidrios que contienen  $\text{CaO}$ ,  $\text{SiO}_2$  y  $\text{P}_2\text{O}_5$  presentan una velocidad mayor de formación de la capa de HA sobre su superficie que los vidrios de  $\text{CaO}$  y  $\text{SiO}_2$  libres de  $\text{P}_2\text{O}_5$ , ya que los primeros tienen puntos favorables para la nucleación de HA, mientras que los últimos deben formar la capa rica en  $\text{SiO}_2$  para que se forme la capa de HA.

## **I.5.Biocompatibilidad. Ensayos *in vitro***

Un material utilizado como implante siempre va a producir una respuesta en el organismo donde se ha aplicado o implantado.

El factor más importante que distingue a un biomaterial de cualquier otro material es su habilidad de producir una aceptación biológica en el huésped, esto se conoce como

biocompatibilidad [53]. Una definición reciente de este término, ha sido propuesta por Williams D. y col, como:

*“La capacidad de un biomaterial de realizar una función deseada con respecto a una terapia médica, sin producir ningún efecto local o sistémico indeseable en el receptor de esa terapia, pero generando el beneficio celular o la respuesta del tejido más apropiada a esa situación específica, y optimizando la ejecución clínica relevante a esa terapia”* [53].

Debido a que pueden existir reacciones adversas a la implantación clínica de los biomateriales, se hace necesaria una evaluación preclínica que incluye diversos niveles de experimentación. De esta manera, existe una normalización de protocolos, tanto *in vitro* como *in vivo* y de seguimiento clínico, de evaluación experimental de biomateriales [54].

Los ensayos *in vitro* de biocompatibilidad son métodos menos costosos para estudiar el desarrollo de nuevos biomateriales, reduciendo la probabilidad de sorpresas en los ensayos con animales o en los ensayos clínicos. Sin ensayos previos en laboratorio con cultivos, la etapa *in vivo* (ensayos con animales de experimentación) sería más costosa y con un mayor consumo de tiempo [55].

Los ensayos *in vitro* de biocompatibilidad se realizan aplicando líneas celulares como cultivos *in vitro*.

### **I.5.1.Cultivos celulares**

En las primeras fases de experimentación y validación de la biocompatibilidad de un nuevo biomaterial, los cultivos celulares se han establecido como una herramienta válida y eficaz para su estudio.

El uso de los cultivos celulares con el fin de estudiar la biocompatibilidad de un biomaterial es relativamente reciente y constituye una potente herramienta, que ayuda a inferir resultados previos a los ensayos *in vivo* y de experimentación clínica.

En los ensayos con cultivos celulares se busca reproducir artificialmente las condiciones del entorno necesarias para garantizar la viabilidad de las células de un organismo vivo [56].

El uso de cultivos celulares en estudios de biocompatibilidad presenta una serie de ventajas, tales como la extrema sensibilidad de los cultivos a los agentes tóxicos, la

posibilidad de investigar interacciones a nivel celular o molecular, y la habilidad para realizar largas series de experimentos bajo las mismas condiciones. Además, por ahora, es la única posibilidad de estudios sobre células.

De cualquier manera los ensayos *in vitro* no eliminan la necesidad de realizar ensayos posteriores *in vivo* sobre animales de experimentación, con el fin de analizar y detectar procesos negativos de respuesta tisular como la formación de tejido fibroso, inflamación, carcinogénesis, etc. Igualmente, determinados resultados *in vitro* no presuponen idéntica condición en las pruebas *in vivo*, ya que los ensayos *in vitro* son una parte simplificada de los mecanismos complejos que ocurren *in vivo* [56]. Por esto se hace necesario el seguimiento y análisis continuo y temporal, incluso durante años, de los resultados *in vitro*, *in vivo* y clínicos.

En la presente investigación solo se va a tratar el estudio de la biocompatibilidad de los materiales desarrollados mediante ensayos *in vitro* con cultivos celulares.

### **I.5.2.Líneas celulares**

Los cultivos celulares se derivan de un cultivo primario o de una línea celular. El primero se refiere a células de tejido que son aisladas y cultivadas *in vitro* sin haber sido subcultivadas. Las células primarias son generalmente heterogéneas, con una fracción baja de células de crecimiento, pero contienen una variedad de tipos de células las cuales son representativas del tejido. El subcultivo permite la propagación de las células, lo que se conoce como línea celular, generalmente son más uniformes [56].

#### *Línea celular continua*

Las líneas celulares continuas, aisladas originalmente de un neoplasma o transformadas por virus o mutagénesis, están disponibles en compañías o en la colección de tipo de cultivos de America (ATCC) (Maryland, USA). Entre las ventajas de usar estas líneas están: que representa una fuente abundante de células homogéneas, y que las condiciones de cultivo están cuidadosamente estandarizadas. Entre las desventajas de su uso están: que se pueden contaminar fácilmente por microplasma o PPLO (pleuropneumonia) del serum, tripsina o por el operador, llevando a la degeneración del cultivo. Además, es arbitrario el transferir

resultados *in vitro* usando células de un tumor a la situación clínica *in vivo* donde se presentan células normales [54].

En la presente investigación se han usado células MG63 para las primeras etapas de estudio de biocompatibilidad. La MG63 es la línea celular más similar a las células osteoblásticas humanas (células del tipo osteoblastos y no osteoblastos normales) provenientes de un osteosarcoma humano [57-59].

#### *Línea celular desarrollada desde células madre*

Con el fin de minimizar las diferencias existentes entre los ensayos *in vitro* e *in vivo* es deseable el uso de células humanas, dependiendo del uso final del implante existen diferentes células que se pueden usar, como se muestra en la tabla I.3.

Las células madre son células multipotenciales sin diferenciarse las cuales residen en varios tejidos humanos y tienen el potencial para diferenciarse en osteoblastos, condrocitos, adipocitos, fibroblastos y otros tejidos de origen mesenquimal. Su uso depende de la citocompatibilidad específica que se quiera evaluar, la tabla I.3 muestra las células a usar dependiendo de lo que se quiera estudiar [53;56;60].

**Tabla I.3.**

*Tipo de células usadas dependiendo de la respuesta del biomaterial que se quiera estudiar.*

<b>Citocompatibilidad a Estudiar</b>	<b>Tipo de células</b>
Actividad de Inmunomodulación	Linfocitos Macrófagos Granulocitos
Modulación de la coagulación	Endotelial
Actividad de formación de hueso	Osteoblastos
Capacidad citoadhesiva	Cornéales

Es importante la utilización de células especializadas, con las cuales la superficie del biomaterial va a estar en contacto una vez sea implantado, porque se simula mejor las condiciones con las que se encontrará el biomaterial en el cuerpo humano.

### I.5.3. Ensayos de biocompatibilidad

Se utilizan diversos test *in vitro* para determinar la biocompatibilidad, estos están basados en diferentes métodos y principios, como se muestra en la tabla I.4 [54].

Las respuestas más fundamentales e importantes de las células frente a un biomaterial son la viabilidad, la proliferación celular y la adhesión.

**Tabla I.4.**

*Tipos de ensayos biológicos utilizados en los estudios de biocompatibilidad de biomateriales.*

Ensayos	Metodología
Viabilidad y citotoxicidad	Ensayo de MTT. Tinción de Trypan Blue. Tinción rojo neutro. Tinción de yoduro de propidio. Test de liberación de Cr.
Proliferación y adhesión celular	Ensayo de Alamar Blue. Test de síntesis de proteínas. Test de síntesis de DNA. Test de antígenos de proliferación. Microscopía electrónica de Barrido (MEB). Microscopía confocal láser.
Biodegradación	Test de biodegradabilidad por microorganismos, soluciones salinas, cultivo de macrófagos.
Mutagénesis-carcinogénesis	Test de Ames. Test del gen HPRT. Test citogenético. Test de micronúcleos. Test de reparación primaria del DNA. Test de inducción de transformación celular.

#### *Viabilidad y proliferación celular*

La viabilidad celular se refiere a la cantidad de células que permanecen vivas y viables en un cultivo, mientras que la proliferación celular supone una medida del crecimiento o división celular que ocurre en un cultivo y se produce por adhesión de las células al sustrato (el biomaterial), por esto la proliferación es un factor que va unido al de adhesión.



### *Adhesión y migración celular*

La migración celular requiere interacciones dinámicas entre la célula, el sustrato y el citoesqueleto. Primeramente, las células desarrollan una protuberancia de su límite frontal para formar un lamelopodio, las células usan interacciones adhesivas para generar la tracción y las energías requeridas para el movimiento de la célula. Segundo, después de la formación y fijación del lamelopodio, las células usan interacciones adhesivas para generar la tracción y las energías requeridas para el movimiento de las células. El último paso del ciclo de migración es disminuir la adhesión, contraerse y levantarse [61].

El término adhesión en biomateriales incluye diferentes fenómenos: la fase de sujeción, la cual ocurre rápidamente e involucra eventos fisicoquímicos entre el material y las células que envuelven fuerzas iónicas, de Van der Waals, etc. Por otro lado está la fase de adhesión la cual involucra varias moléculas biológicas: proteínas de matriz extracelular, proteínas de la membrana celular y de las proteínas del citoesqueleto, las cuales interactúan juntas para inducir transducción de señal, promoviendo la acción de los factores de transcripción y por consiguiente regulando la expresión genética [61;62].

Los métodos que cuantifican la proliferación celular se basan en determinaciones inmunohistoquímicas, cuantificación de la síntesis de ADN y proteínas mediante marcadores radioactivos, medida de la reducción del medio de cultivo, tinción de células o moléculas por colorantes específicos, etc.

## REFERENCIAS

- [1] D. F. Williams, "Definitions of Biomaterials," 4 ed Amsterdam: Elsevier, 1987.
- [2] K. D. Jandt, "Evolutions, Revolutions and Trends in Biomaterials Science - A Perspective," *Advanced Engineering Materials*, vol. 9, no. 12, pp. 1035-1050, 2007.
- [3] J. R. Porter, T. T. Ruckh, and K. C. Papat, "Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies," *Biotechnology Progress*, vol. 25, no. 6, pp. 1539-1560, 2009.
- [4] M. Vallet-Regi and J. M. Gonzalez-Calbet, "Calcium phosphates as substitution of bone tissues," *Progress in Solid State Chemistry*, vol. 32, no. 1-2, pp. 1-31, 2004.
- [5] W. Suchanek and M. Yoshimura, "Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants," *Journal of Materials Research*, vol. 13, no. 1, pp. 94-117, 1998.
- [6] S. M. Best, A. E. Porter, E. S. Thian, and J. Huang, "Bioceramics: Past, present and for the future," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 28, no. 7, pp. 1319-1327, 2008.
- [7] L. L. Hench, "Bioceramics - from Concept to Clinic," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, no. 7, pp. 1487-1510, 1991.
- [8] D. F. Williams, "Tissue-Biomaterial Interaction," *Journal Material Science*, vol. 22, pp. 3241-3245, 1987.
- [9] J. A. Hubbell, "Biomaterials in Tissue Engineering," *Bio-Technology*, vol. 13, no. 6, pp. 565-576, 1995.
- [10] D. Zaffe, "Some considerations on biomaterials and bone," *Micron*, vol. 36, no. 7-8, pp. 583-592, 2005.
- [11] M. P. Ferraz, M. H. Fernandes, J. D. Santos, and F. J. Monteiro, "HA and double-layer HA-P2O5/CaO glass coatings: influence of chemical composition on human bone marrow cells osteoblastic behavior," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 629-638, 2001.
- [12] H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. Gonzalez, B. Leon, N. Almeida, S. Cachinho, E. J. C. Davim, R. Correia, J. M. Oliveira, and M. H. V. Fernandes, "Orthophosphate nanostructures in SiO2-P2O5-CaO-Na2O-MgO bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, no. 34, pp. 4075-4080, 2008.
- [13] O. H. Andersson and K. H. Karlsson, "On the Bioactivity of Silicate Glass," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 129, no. 1-3, pp. 145-151, 1991.
- [14] D. R. Bloyer, J. M. Gomez-Vega, E. Saiz, J. M. McNaney, R. M. Cannon, and A. P. Tomsia, "Fabrication and characterization of a bioactive glass coating on titanium implant alloys," *Acta Materialia*, vol. 47, no. 15-16, pp. 4221-4224, 1999.

- [15] P. N. De Aza, A. H. De Aza, P. Pena, and S. De Aza, "Bioactive glasses and glass-ceramics," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 46, no. 2, pp. 45-55, 2007.
- [16] P. N. De Aza and S. De Aza, "Biovidrios y vitrocerámicas bioactivas," in *Biomateriales*. F. J. Monteiro and J. San Roman, Eds. España: CYTED, 2004, p. 522.
- [17] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907-2915, 2006.
- [18] K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura, and M. Oka, "Bioactivity of Ca-SiO<sub>2</sub> Glasses Added with Various Ions," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 95-100, 1992.
- [19] F. J. Gil, M. P. Ginebra, D. Lacroix, and J. A. Planell, "Biometales," in *Biomateriales*. F. J. Monteiro and J. San Roman, Eds. España: CYTED, 2004, p. 522.
- [20] L. G. Griffith, "Polymeric biomaterials," *Acta Materialia*, vol. 48, no. 1, pp. 263-277, 2000.
- [21] L. L. Hench and J. Wilson, *An introduction to bioceramics*. London: 1993.
- [22] D. F. Williams, "On the nature of biomaterials," *Biomaterials*, vol. 30, no. 30, pp. 5897-5909, 2009.
- [23] L. A. Pruitt, "Deformation, yielding, fracture and fatigue behavior of conventional and highly cross-linked ultra high molecular weight polyethylene," *Biomaterials*, vol. 26, no. 8, pp. 905-915, 2005.
- [24] I. Manjubala, S. Scheler, J. Bossert, and K. D. Jandt, "Mineralisation of chitosan scaffolds with nano-apatite formation by double diffusion technique," *Acta Biomaterialia*, vol. 2, no. 1, pp. 75-84, 2006.
- [25] J. W. Boretos, "Past, Present and Future-Role of Polyurethanes for Surgical Implants," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 52, no. 7, pp. 1851-1855, 1980.
- [26] P. N. De Aza, A. H. De Aza, and S. De Aza, "Crystalline bioceramic materials," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 44, no. 3, pp. 135-145, 2005.
- [27] P. N. De Aza and S. De Aza, "Biocerámicas," in *Biomateriales*. F. J. Monteiro and J. San Roman, Eds. España: CYTED, 2004, p. 522.
- [28] D. W. Jones, *Ceramic biomaterials*. Clausthal Zellerfeld: Trans Tech Publications, 1996, pp. 345-383.
- [29] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, and J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137-1158, 2008.
- [30] P. Müller, U. Bulnheim, A. Diener, F. Luthen, M. Teller, E. D. Klinkenberg, H. G. Neumann, B. Nebe, A. Liebold, G. Steinhoff, and J. Rychly, "Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 281-291, 2008.

- 
- [31] J. Chevalier and L. Gremillard, "Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, no. 7, pp. 1245-1255, 2009.
- [32] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate cements for biomedical application," *Journal of Materials Science*, vol. 43, no. 9, pp. 3028-3057, 2008.
- [33] J. M. Smartt, J. Karmacharya, F. H. Gannon, G. Ong, O. Jackson, S. P. Bartlett, R. D. Poser, and R. E. Kirschner, "Repair of the immature and mature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate cement: Assessment of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 115, no. 6, pp. 1642-1650, 2005.
- [34] Q. Liu, J. R. deWijn, and C. A. vanBlitterswijk, "Nano-apatite/polymer composites: Mechanical and physicochemical characteristics," *Biomaterials*, vol. 18, no. 19, pp. 1263-1270, 1997.
- [35] V. J. Shirtliff and L. L. Hench, "Bioactive materials for tissue engineering, regeneration and repair," *Journal of Materials Science*, vol. 38, no. 23, pp. 4697-4707, 2003.
- [36] L. L. Hench and J. M. Polak, "Third-generation biomedical materials," *Science*, vol. 295, no. 5557, p. 1014, 2002.
- [37] R. Li, A. E. Clark, and L. L. Hench, "An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing," *Journal of Applied Biomaterials*, vol. 2, no. 4, pp. 231-239, 1991.
- [38] Z. Strnad, *Glass-ceramic materials*. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 1986.
- [39] W. Höland and G. Beall, *Glass-ceramic technology*. Ohio, United States of America: The American Ceramic Society, 2002.
- [40] T. Kokubo, "Bioactive Glass-Ceramics - Properties and Applications," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155-163, 1991.
- [41] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Mechanical-Properties of A New Type of Apatite-Containing Glass Ceramic for Prosthetic Application," *Journal of Materials Science*, vol. 20, no. 6, pp. 2001-2004, 1985.
- [42] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161-2175, 2003.
- [43] P. W. McMillan, *Glass-Ceramics*. London: Academic Press, 1979.
- [44] T. Kokubo, S. Ito, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Formation of A High-Strength Bioactive Glass Ceramic in the System  $MgO-CaO-SiO_2-P_2O_5$ ," *Journal of Materials Science*, vol. 21, no. 2, pp. 536-540, 1986.
- [45] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Fatigue and Lifetime of Bioactive Glass Ceramic A-W Containing Apatite and Wollastonite," *Journal of Materials Science*, vol. 22, no. 11, pp. 4067-4070, 1987.
- [46] T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Ca, P-Rich Layer Formed on High-Strength Bioactive Glass-Ceramic A-W," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 24, no. 3, pp. 331-343, 1990.

- [47] L. L. Hench and J. Wilson, "Surface-Active Biomaterials," *Science*, vol. 226, no. 4675, pp. 630-636, 1984.
- [48] T. Kitsugi, T. Nakamura, T. Yamamura, T. Kokubu, T. Shibuya, and M. Takagi, "Sem-Epma Observation of 3 Types of Apatite-Containing Glass-Ceramics Implanted in Bone - the Variance of A Ca-P-Rich Layer," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 21, no. 10, pp. 1255-1271, 1987.
- [49] T. Kokubo, "Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment," *Acta Materialia*, vol. 46, no. 7, pp. 2519-2527, 1998.
- [50] T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Solutions Able to Reproduce In vivo Surface-Structure Changes in Bioactive Glass-Ceramic A-W3," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 24, no. 6, pp. 721-734, 1990.
- [51] C. Ohtsuki, Y. Aoki, T. Kokubo, Y. Bando, M. Neo, and T. Nakamura, "Transmission Electron-Microscopic Observation of Glass-Ceramic A-W and Apatite Layer Formed on Its Surface in A Simulated Body-Fluid," *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 103, no. 5, pp. 449-454, 1995.
- [52] T. Kitsugi, T. Yamamuro, T. Nakamura, and T. Kokubo, "The Bonding of Glass-Ceramics to Bone," *International Orthopaedics*, vol. 13, no. 3, pp. 199-206, 1989.
- [53] A. Pizzoferrato, A. Vespucci, G. Ciapetti, and S. Stea, "Biocompatibility Testing of Prosthetic Implant Materials by Cell-Cultures," *Biomaterials*, vol. 6, no. 5, pp. 346-351, 1985.
- [54] R. I. Freshney, *Culture of animal cells: a manual of basic technique*, 4 ed. New York: Wiley-Liss, 2000.
- [55] C. T. Hanks, J. C. Wataha, and Z. L. Sun, "In vitro models of biocompatibility: A review," *Dental Materials*, vol. 12, no. 3, pp. 186-193, 1996.
- [56] A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, S. Stea, E. Cenni, C. R. Arciola, D. Granchi, and L. Savarino, "Cell cultures methods for testing biocompatibility," *Clinical Materials*, vol. 15, pp. 173-190, 1994.
- [57] B. D. Boyan, R. Batzer, K. Kieswetter, Y. Liu, D. L. Cochran, S. Szmuckler-Moncler, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1  $\alpha$ ,25-(OH)(2)D-3," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 39, no. 1, pp. 77-85, 1998.
- [58] F. Carinci, F. Pezzetti, S. Volinia, F. Francioso, D. Arcelli, E. Farina, and A. Piattelli, "Zirconium oxide: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology," *Biomaterials*, vol. 25, no. 2, pp. 215-228, 2004.
- [59] J. Y. Martin, Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. M. Schraub, J. Simpson, J. Lankford, D. D. Dean, D. L. Cochran, and B. D. Boyan, "Effect of Titanium Surface-Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein-Synthesis of Human Osteoblast-Like Cells (Mg63)," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, no. 3, pp. 389-401, 1995.
- [60] I. Pountos, D. Corscadden, P. Emery, and P. V. Giannoudis, "Mesenchymal stem cell tissue engineering: Techniques for isolation, expansion and application," *Injury-International Journal of the Care of the Injured*, vol. 38, p. S23-S33, 2007.

- [61] K. Anselme, "Osteoblast adhesion on biomaterials," *Biomaterials*, vol. 21, no. 7, pp. 667-681, 2000.
- [62] K. Anselme and M. Bigerelle, "Modelling approach in cell/material interactions studies," *Biomaterials*, vol. 27, no. 8, pp. 1187-1199, 2006.

## **CAPÍTULO II**

### **PROPÓSITO DEL TRABAJO**



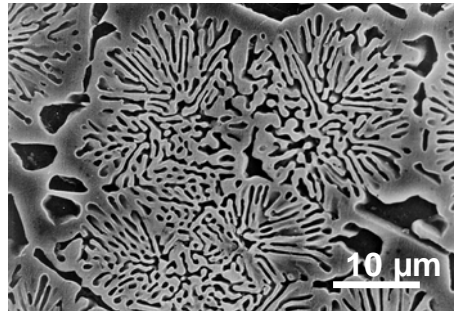


## **II. PROPÓSITO DEL TRABAJO**

Los biomateriales, naturales y sintéticos, se utilizan clínicamente desde hace años en la reconstrucción de estructuras anatómicas por estética o por razones terapéuticas en diferentes situaciones quirúrgicas [1-9]. Las cerámicas de fosfato de calcio se utilizan con éxito en cirugía traumatológica, dentaria y maxilofacial desde hace 30 años en la reparación de tejido óseo debido a su biocompatibilidad, bioactividad y osteoconductividad [1;4]. En las últimas décadas, se han realizado importantes investigaciones con el fin de desarrollar nuevos materiales de fosfato de calcio dopado para mejorar su osteogénesis, velocidad de bioreabsorción y/o resistencia mecánica. El óxido de silicio en particular [10-18] ha recibido gran atención como elemento dopante en las cerámicas, vitrocerámicas y vidrios basados en fósforo. En estas investigaciones se ha encontrado que el óxido de silicio juega un papel importante en los eventos metabólicos que conducen a la formación de hueso endocondral e intramembranoso [19;20] y, junto con los óxidos de calcio, sodio y fósforo (como el 45S5 Bioglass<sup>®</sup>), actúa sobre la expresión de ciertos genes responsables del control del ciclo celular de los osteoblastos animales y humanos y estimula la osteoproducción [21;22].

De acuerdo con las consideraciones anteriores, materiales con contenido silicio, fósforo y calcio son buenos candidatos para diseñar biocerámicas y vitrocerámicas con propiedades osteogénicas mejoradas. Con estos elementos se han diseñado diferentes materiales [1-4], por ejemplo Kokubo y col. [23] han desarrollado un vitrocerámico compuesto de apatita y wollastonita (Cerabone<sup>®</sup>) como fases cristalinas, utilizando un procesamiento que incluye la fusión del vidrio seguida de molienda, compactación del polvo de vidrio y posterior desvitrificación. Este material presenta alta bioactividad y biocompatibilidad [7;24;25]. Basados en los elementos antes mencionados, De Aza y col. [26] han desarrollado una biocerámica densa policristalina (Bioeutético<sup>®</sup>). Esta cerámica contiene dos fases cristalinas, pseudowollastonita ( $\text{CaSiO}_3=\text{psW}$ ) y  $\alpha$ -fosfato tricálcico ( $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2=\alpha\text{-TCP}$ ). El Bioeutético<sup>®</sup> se obtiene mediante solidificación controlada del fundido de la composición eutéctica del sistema binario wollastonita-fosfato tricálcico (W-TCP) (60 % peso wollastonita y 40 % peso fosfato tricálcico [27]. La microestructura de este biocerámico está formada por colonias cuasi-esféricas con un tamaño medio de  $20 \pm 5 \mu\text{m}$  formadas por cristales en forma de láminas alternadas de psW y  $\alpha$ -TCP con una anchura media de 1,5 y 0,9  $\mu\text{m}$  respectivamente (véase figura 2.1.) y presenta una microestructura similar a la del hueso. Esta cerámica de composición eutéctica tiene la propiedad de

reestructurar su morfología durante su inmersión en suero fisiológico artificial [28] o saliva de parótida humana [29], mediante la disolución de la fase psW y la subsecuente transformación pseudomórfica del  $\alpha$ -TCP en hidroxiapatita (HA), por lo tanto es un material bioactivo con un gran potencial para una buena osteointegración.



**Figura 2.1.** Microestructura del Bioeutético<sup>®</sup> formado por colonias cuasi esféricas unidas entre si, formadas por laminillas alternadas de W (fase gris) y TCP (zona oscura, formada después de un ataque químico).

Los procedimientos usados hasta el momento para obtener este material, enfriamiento controlado del fundido o crecimiento de la microestructura eutéctica en un horno de solidificación direccional por láser [26;30;31], limitan el tamaño y la forma de las piezas obtenidas, además son procesos de síntesis muy lentos y caros. Por otro lado, la porosidad interconectada generada, consecuencia del diámetro de las laminillas de psW disuelta, tiene un diámetro de poro demasiado pequeño ( $\sim 1,5 \mu\text{m}$ ) para facilitar la vascularización del implante.

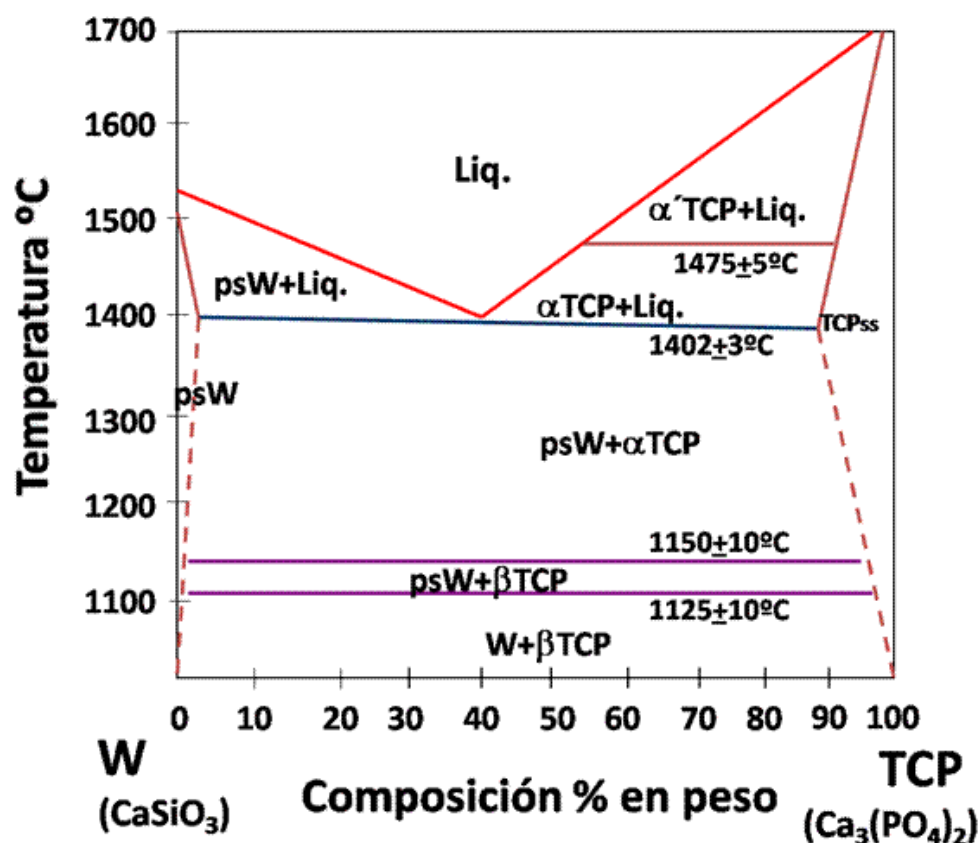
Durante la presente tesis doctoral se ha desarrollado una investigación sobre la obtención de biomateriales de la misma composición química que el Bioeutético<sup>®</sup> (composición eutéctica del sistema W-TCP) pero mediante el proceso vitrocerámico, teniendo en cuenta que mediante esta técnica, en principio, es posible diseñar a medida el tamaño, la forma y la microestructura de los materiales que se obtengan dentro del sistema W-TCP. La tecnología vitrocerámica presenta dos ventajas:

- Permite fabricar piezas grandes y con formas complejas de una forma económica mediante las técnicas habituales, y bien establecidas, del procesamiento de materiales vitrocerámicos (fusión, conformado en caliente y desvitrificación controlada) [32-35].

- Los materiales vitrocerámicos, por lo general exhiben una microestructura homogénea, sin poros o con algunos poros residuales. Mediante un buen conocimiento y control del proceso de cristalización y de los mecanismos de nucleación y crecimiento de las fases cristalinas [36], se pueden obtener vitrocerámicos con una gran variedad de microestructuras lo que permite optimizar tanto las propiedades mecánicas como la bioactividad de los productos finales.

En la actualidad los materiales vitrocerámicos se pueden obtener a partir de un vidrio en masa o bien de un polvo de vidrio compactado. Los vitrocerámicos con aplicaciones médicas existentes en el mercado, como por ejemplo el Cerabone<sup>®</sup> antes mencionado, se fabrican partiendo del polvo de vidrio compactado. Un vitrocerámico obtenido por desvitrificación de un vidrio en masa (como se plantea en la presente tesis doctoral), es decir sin moler y prensar el vidrio, tendrá un proceso de preparación mas simple, con una menor susceptibilidad de contaminación, y por ende un menor coste de fabricación de los implantes. Además, se espera que el porcentaje de porosidad presente en los materiales desarrollados sea nulo y por lo tanto tengan iguales o mayores propiedades mecánicas que el Cerabone<sup>®</sup>.

La composición eutéctica del sistema W-TCP (véase figura 2.2.), representa la composición con menor temperatura de fusión para ese sistema. Como se ha descrito en el capítulo I (Introducción), diferentes investigaciones han determinado que la presencia de fósforo no es esencial para que un material conteniendo calcio y silicio sea bioactivo, pero en el presente estudio la importancia del fósforo radica en su comportamiento como agente nucleante en los vidrios, lo que promueve una nucleación homogénea [33;34;36;37].



**Figura 2.2.** Sistema wollastonita-fosfato tricálcico [27]. Liq.: líquido, TCP: fosfato tricálcico, psW: pseudowollastonita.

Teniendo en cuenta todo lo anteriormente expuesto, en la presente tesis doctoral se ha estudiado una nueva ruta para la obtención de materiales de composición eutéctica dentro del sistema Wollastonita-Fosfato Tricálcico, mediante el proceso vitrocerámico partiendo de un vidrio en masa. Es de prever la obtención de materiales libres de defectos, con mejores propiedades mecánicas que el vidrio original y una biocompatibilidad mejorada. Según el ciclo de desvitrificación empleado el material final puede presentar distintas fases y proporciones de las mismas. Lo cual afectará a sus propiedades como biomaterial.

## II.1. Objetivo de la investigación

La presente tesis persigue un objetivo de gran incidencia social, como es la mejora de la salud y de la calidad de vida de la población, mediante el diseño y obtención de vitrocerámicas y/o biocerámicas para regeneración o sustitución ósea. Para ello se pondrá de manifiesto cómo, a partir de la información suministrada por el diagrama de equilibrio de fases wollastonita ( $\text{CaSiO}_3 = \text{W}$ ) – fosfato tricálcico ( $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = \text{TCP}$ ) y mediante el

estudio experimental de los parámetros de procesamiento de vitrocerámicos y el análisis de los mecanismos de cristalización del vidrio de composición eutéctica W-TCP es posible diseñar, procesar y obtener vitrocerámicos y/o biocerámicas con distintos porcentajes de fases ricas en silicio, calcio y/o fósforo con microestructuras controladas para aplicaciones biomédicas.

Los vitrocerámicos obtenidos se caracterizarán microestructuralmente. Sobre el vitrocerámico optimizado se realizarán estudios *in vitro* en suero fisiológico artificial y en cultivos celulares para determinar su bioactividad.

Estos vitrocerámicos y/o biocerámicas pueden encontrar aplicaciones potenciales, aparte de en la regeneración o sustitución ósea, como carga de implantes dentales, en la formulación de cementos óseos o como recubrimientos de implantes metálicos.

Con el fin de alcanzar los mencionados objetivos se han establecido los siguientes objetivos parciales:

- Obtener y caracterizar el vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP.
- Estudiar el proceso de desvitrificación del vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP.
- Seleccionar un tratamiento térmico para obtener un material apropiado para ser usado como sustituto óseo.
- Caracterizar el vitrocerámico obtenido desde un punto de vista físico, químico y biológico.

## **II.2. Obtención y caracterización del vidrio de composición eutéctica del sistema wollastonita-fosfato tricálcico**

El vidrio de composición eutéctica del sistema se ha obtenido mediante fusión en horno eléctrico, en un crisol de Pt-10% Rh, a partir de la mezcla de los óxidos. El fundido obtenido se ha colado sobre una placa de latón.

### **II.2.1. Caracterización del vidrio obtenido**

El vidrio obtenido se ha caracterizado desde un punto de vista:

-*Térmico*: Determinación del coeficiente de expansión térmica mediante dilatometría, de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) mediante análisis térmico diferencial (ATD) y dilatometría. Determinación de la temperatura de fusión, mediante microscopía de calefacción y análisis térmico diferencial (ATD). Determinación de la temperatura de cristalización mediante ATD.

-*Estructural*: Resonancia magnética nuclear (RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ ).

-*Microestructural*: Microscopía Electrónica Barrido (MEB) y de Transmisión (TEM) con Difracción de un Área Seleccionada (DAS).

-*Mecánico*: Determinación de las propiedades mecánicas del vidrio: módulo de rotura, mediante el ensayo de flexión en tres puntos, dureza Vickers y resistencia a la propagación de grieta mediante indentación; módulo de Young mediante la técnica de resonancia.

-*Estudios “In Vitro”*: Bioactividad en Suero Fisiológico Artificial y biocompatibilidad mediante cultivos celulares de células MG63.

## **II.3. Estudio de la desvitrificación del biovidrio de composición eutéctica del sistema Wollastonita - Fosfato Tricálcico**

### **II.3.1. Estudio no-isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico**

El proceso no-isotérmico de desvitrificación del vidrio de composición eutéctica se ha estudiado *in situ* mediante difracción de neutrones desde temperatura ambiente hasta 1375°C en un horno de vacío. Los datos obtenidos se han comparado con los obtenidos mediante ATD y con los de muestras tratadas térmicamente en aire y posteriormente caracterizadas por Difracción de Rayos X (DRX) y Microscopía Electrónica de Barrido con microanálisis mediante un espectrómetro de dispersión de energías de rayos X (MEB-EDS).

### **II.3.2. Estudio isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico**

El estudio isotérmico de la desvitrificación se ha realizado con el objetivo de determinar el diagrama Transformación Tiempo-Temperatura (TTT) del vidrio. En este sentido, se han realizado tratamientos térmicos a diferentes temperaturas y durante diferentes períodos de tiempo. Después del tratamiento térmico las muestras se han caracterizado mediante: DRX, MEB-EDS, MET-DAS y RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ .

## **II.4.Diseño, Preparación y caracterización de un vitrocerámico dentro del sistema seleccionado**

Con los datos obtenidos del estudio de desvitrificación, se ha establecido el tratamiento térmico óptimo para obtener un vitrocerámico de apatita – wollastonita 2M partiendo de una muestra del vidrio eutéctico W-TCP en masa.

### **II.4.1.Caracterización del vitrocerámico obtenido**

El vitrocerámico obtenido se ha caracterizado desde un punto de vista:

-*Químico*: mediante FRX, para comprobar que se mantiene la composición de partida sin pérdida de ningún elemento volátil, como el fósforo.

-*Mineralógica*: cualitativamente mediante DRX y cuantitativamente, aplicando la metodología Rietveld.

-*Estructural*: mediante RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ .

-*Microestructural*: mediante MEB-EDS y MET-DAS.

-*Mecánico*: Determinación de las propiedades mecánicas del vitrocerámico (módulo de rotura, mediante el ensayo de flexión en tres puntos, dureza Vickers y resistencia a la propagación de grieta mediante indentación; módulo de Young mediante técnica de resonancia).

-*Bioactivo*: Reactividad en Suero Fisiológico Artificial (SFA).

-*Biocompatible*: Ensayos con cultivos celulares de células madre de medula ósea humana (HBMSC, siglas en inglés).

## REFERENCIAS

- [1] L. L. Hench and J. Wilson, *An introduction to bioceramics*. London: 1993.
- [2] J. S. Temenoff and A. G. Mikos, *Biomaterials: the intersection of biology and materials science*. London: Pearson International Edition, 2008, p. 481.
- [3] De Aza S., Sastre R., and San Roman J., *Biomateriales*. España: 2004, p. 522.
- [4] L. L. Hench, "Bioceramics - from Concept to Clinic," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 74, no. 7, pp. 1487-1510, 1991.
- [5] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano, and J. A. Planell, "Biomaterials in orthopaedics," *Journal of the Royal Society Interface*, vol. 5, no. 27, pp. 1137-1158, 2008.
- [6] M. Cerruti and N. Sahai, *Silicate biomaterials for orthopaedic and dental implants*. CHANTILLY: MINERALOGICAL SOC AMERICA, 2006, pp. 283-313.
- [7] T. Kokubo, H. M. Kim, and M. Kawashita, "Novel bioactive materials with different mechanical properties," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2161-2175, 2003.
- [8] A. Hertz and I. J. Bruce, "Inorganic materials for bone repair or replacement applications," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 6, pp. 899-918, 2007.
- [9] M. Vallet-Regi, C. V. Ragel, and A. J. Salinas, "Glasses with medical applications," *European Journal of Inorganic Chemistry*, no. 6, pp. 1029-1042, 2003.
- [10] S. M. Best, S. Zou, R. Brooks, J. Huang, N. Rushton, and W. Bonfield, *The osteogenic behaviour of silicon substituted hydroxyapatite* 2008, pp. 985-988.
- [11] E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings," *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 27, no. 2, pp. 251-256, 2007.
- [12] E. S. Thian, J. Huang, M. E. Vickers, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications," *Journal of Materials Science*, vol. 41, no. 3, pp. 709-717, 2006.
- [13] S. V. Dorozhkin, "In vitro mineralization of silicon containing calcium phosphate bioceramics," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 90, no. 1, pp. 244-249, 2007.
- [14] C. M. Botelho, R. A. Brooks, S. M. Best, M. A. Lopes, J. D. Santos, N. Rushton, and W. Bonfield, "Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 79A, no. 3, pp. 723-730, 2006.
- [15] A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics," *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4609-4620, 2003.
- [16] N. Patel, S. M. Best, W. Bonfield, I. R. Gibson, K. A. Hing, E. Damien, and P. A. Revell, "A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon



- substituted hydroxyapatite granules," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 13, no. 12, pp. 1199-1206, 2002.
- [17] A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface," *Biomaterials*, vol. 25, no. 16, pp. 3303-3314, 2004.
- [18] I. R. Gibson, K. A. Hing, P. A. Revell, J. D. Santos, S. M. Best, and W. Bonfield, "Enhanced in vivo response to silicate-substituted hydroxyapatite," *Bioceramics 14*, vol. 218-2, pp. 203-206, 2002.
- [19] E. M. Carlisle, "Silicon Requirement for Normal Skull Formation in Chicks," *Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 2, pp. 352-359, 1980.
- [20] E. M. Carlisle, "Biochemical and Morphological-Changes Associated with Long-Bone Abnormalities in Silicon Deficiency," *Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 5, pp. 1046-1056, 1980.
- [21] L. L. Hench, "Glass and genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture," *Glass Technology*, vol. 44, no. 1, pp. 1-10, 2003.
- [22] R. C. Bielby, R. S. Pryce, L. L. Hench, and J. M. Polak, "Enhanced derivation of osteogenic cells from murine embryonic stem cells after treatment with ionic dissolution products of 58S bioactive sol-gel glass," *Tissue Engineering*, vol. 11, no. 3-4, pp. 479-488, 2005.
- [23] T. Kokubo, S. Ito, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Formation of A High-Strength Bioactive Glass Ceramic in the System Mgo-Cao-Sio2-P2O5," *Journal of Materials Science*, vol. 21, no. 2, pp. 536-540, 1986.
- [24] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Mechanical-Properties of A New Type of Apatite-Containing Glass Ceramic for Prosthetic Application," *Journal of Materials Science*, vol. 20, no. 6, pp. 2001-2004, 1985.
- [25] T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang, T. Hayashi, S. Sakka, T. Kitsugi, and T. Yamamuro, "Ca, P-Rich Layer Formed on High-Strength Bioactive Glass-Ceramic A-W," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 24, no. 3, pp. 331-343, 1990.
- [26] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. De Aza, "Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement," *Biomaterials*, vol. 18, no. 19, pp. 1285-1291, 1997.
- [27] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. De Aza, "Phase-Diagram of Wollastonite-Tricalcium Phosphate," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 78, no. 6, pp. 1653-1656, 1995.
- [28] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. De Aza, "A new bioactive material which transforms in situ into hydroxyapatite," *Acta Materialia*, vol. 46, no. 7, pp. 2541-2549, 1998.
- [29] P. N. De Aza, Z. B. Luklinska, M. R. Anseau, M. Hector, F. Guitian, and S. De Aza, "Reactivity of a wollastonite-tricalcium phosphate Bioeutectic (R) ceramic in human parotid saliva," *Biomaterials*, vol. 21, no. 17, pp. 1735-1741, 2000.
- [30] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. De Aza, "A new bioactive material which transforms in situ into hydroxyapatite," *Acta Materialia*, vol. 46, no. 7, pp. 2541-2549, 1998.

- [31] P. N. De Aza, A. H. De Aza, and S. De Aza, "Crystalline bioceramic materials," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 44, no. 3, pp. 135-145, 2005.
- [32] C. Ohtsuki, Y. Aoki, T. Kokubo, Y. Bando, M. Neo, and T. Nakamura, "Transmission Electron-Microscopic Observation of Glass-Ceramic A-W and Apatite Layer Formed on Its Surface in A Simulated Body-Fluid," *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 103, no. 5, pp. 449-454, 1995.
- [33] P. N. De Aza, A. H. De Aza, P. Pena, and S. De Aza, "Bioactive glasses and glass-ceramics," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 46, no. 2, pp. 45-55, 2007.
- [34] T. Kokubo, "Bioactive Glass-Ceramics - Properties and Applications," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155-163, 1991.
- [35] J. F. Navarro, "El vidrio," Spain: 2003, p. 270.
- [36] W. Vogel, "Structure and crystallization of glasses," Leipzig, Germany: Pergamon Press, 1971, p. 246.
- [37] I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, and R. G. Hill, "Structural analysis of bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 351, no. 2, pp. 173-183, 2005.

### **CAPÍTULO III**

## **MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES**



### III. MÉTODOS Y TÉCNICAS EXPERIMENTALES

#### III.1. Técnicas de análisis de fases

##### III.1.1. Difracción de rayos X (DRX)

La identificación de las distintas fases cristalinas presentes en las muestras tratadas térmicamente se realizó por difracción de rayos X (DRX), a temperatura ambiente. El fundamento de esta técnica se basa en la interacción de los átomos o moléculas (estructura cristalina) que forman un sólido con una fuente de rayos X [1].

La DRX se basa en la dispersión coherente (se mantiene la longitud de onda de la radiación) del haz de rayos X por parte de la materia (cristal) y en la interferencia constructiva de las ondas que están en fase y que se dispersan en determinadas direcciones del espacio tridimensional [1].

El fenómeno de la difracción puede describirse con la ley de Bragg, que predice la dirección en la que se da interferencia constructiva entre haces de rayos X dispersados coherentemente por un cristal:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \theta \quad n = 1, 2, 3, \dots \quad (\text{III.1})$$

donde de  $\lambda$  es la longitud de onda,  $d$  es la distancia interplanar y  $\theta$  es el ángulo de difracción [1].

Aunque, la intensidad de los picos puede variar en una misma muestra dependiendo de su preparación, de posibles orientaciones y de las condiciones instrumentales [2;3], la posición e intensidad de las radiaciones registradas son características de cada sustancia.

##### *Condiciones del ensayo*

Las muestras fueron molidas hasta un tamaño menor a 63  $\mu\text{m}$ , y los difractogramas fueron obtenidos usando un difractómetro automático Siemens D5000, empleando la radiación  $\text{CuK}\alpha_{1,2}$  (1,5418 Å) y un monocromador secundario de grafito.

Los datos fueron recolectados con geometría Bragg-Brentano ( $\theta/2\theta$ ) vertical (modo de reflexión plano), entre 2 y 70° ( $2\theta$ ) con un paso de 0,05° y una permanencia de 5 s en cada paso. Las muestras fueron rotadas a 0,25  $\text{s}^{-1}$  durante la adquisición de los difractogramas, con el fin de obtener un resultado promedio del polvo, lo que es esencial para realizar un

análisis correcto de las fases presentes en las muestras. El tubo de rayos X trabajó a 40 kV y a 30 mA. Para evaluar los difractogramas obtenidos se utilizó la versión 6.0 del programa EVA Diffrac plus.

### III.1.2. Refinamiento Rietveld

El refinamiento de una estructura cristalina por el método Rietveld consiste en minimizar la diferencia entre un difractograma experimental y un difractograma calculado utilizando un modelo estructural aproximado y unos parámetros que permitan distribuir las intensidades de las diferentes reflexiones en el difractograma. Durante el refinamiento, los parámetros atómicos y los globales se optimizan en un procedimiento de mínimos cuadrados hasta obtener el mejor ajuste posible [4;5].

El método Rietveld se usa para el refinamiento de estructuras cristalinas, análisis cuantitativo de fases cristalinas y de fase amorfa, resolución de estructuras cristalinas sin conocimiento estructural previo, estimación del tamaño y forma de los cristalitos y estudio de tensiones residuales [6].

En el presente trabajo se utilizó el método Rietveld para cuantificar las fases presentes en las muestras tratadas térmicamente, incluyendo la fase amorfa. Por lo tanto, se realizaron las medidas usando un patrón interno, considerándolo como una fase más de la muestra. Entonces, si  $W_s$  es el porcentaje del patrón en la mezcla inicial y  $R_s$  es el porcentaje del patrón obtenido del análisis Rietveld, el porcentaje de fase amorfa ( $A$ ) será [7;8]:

$$A = \frac{1 - (W_s / R_s)}{100 - W_s} \cdot 10^{40\%} \quad (\text{III.2})$$

#### *Condiciones del estudio*

Para aplicar este método, se prepararon mezclas con 30 % en peso de  $\text{CaF}_2$  (patrón interno) y 70 % en peso de la muestra tratada térmicamente. La mezcla se realizó en un mortero de ágata y se utilizó acetona para facilitar la homogenización de la misma. A diferencia del análisis cualitativo, explicado anteriormente (sección III.1.1), los difractogramas usados para el análisis mediante el método Rietveld requieren de mayores tiempos de adquisición por lo tanto, el paso se redujo a  $0,03^\circ$  y la permanencia se aumentó a 20 s, lo que permite

obtener difractogramas con mayor calidad, para facilitar el análisis cuantitativo de las fases.

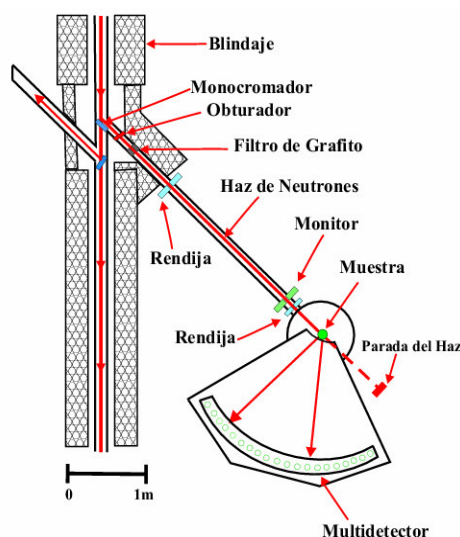
El programa informático utilizado para el estudio de los difractogramas obtenidos fue el GSAS (General Structure Analysis System) [9]. Los parámetros refinados fueron: el desplazamiento de cero, el fondo, los parámetros de la celda y los de la forma de los picos, la orientación preferente y la fracción de las fases presentes.

### **III.1.3. Difracción de neutrones**

La técnica de difracción de neutrones (DN) fue usada para caracterizar la cristalización del vidrio *in situ* durante el calentamiento. Esta técnica es análoga a la difracción de rayos X, solo que los átomos del sólido, del líquido o del gas difractan los neutrones.

#### *Condiciones del ensayo*

Los experimentos de difracción de neutrones fueron realizados en el instrumento D1B del Instituto Laue-Langevin (ILL, Grenoble, Francia). El instrumento empleado es un difractómetro de neutrones que posee un detector de  $^3\text{He}$  (véase figura 3.1.). Este detector, combinado con un flujo alto de neutrones térmicos, permite recolectar difractogramas de  $80^\circ$  de alta calidad en un tiempo cercano a los 2,5 min. La longitud de onda de los neutrones incidentes en la muestra fue de 2,5145 Å. Por otro lado, el ángulo cero fue corregido mediante la medida independiente de una muestra patrón en polvo de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (99,99 % peso, Fluka AG, Buchs SC, Suiza).



**Figura 3.1.** Esquema del difractómetro D1B.

Al equipo de DN se le acopló un horno eléctrico capaz de alcanzar temperaturas de hasta 1375°C. La muestra fue colocada en un cilindro de vanadio, para inducir el calentamiento homogéneo de la misma. La temperatura fue controlada con un termopar de tipo B (Pt30Rh/Pt6Rh), con una precisión de  $\pm 0,5$  °C.

## III.2. Estudio microestructural

### III.2.1. Microscopía óptica de luz reflejada (MOLR)

Con el microscopio óptico de luz reflejada se pueden observar partículas de pocos micrómetros de diámetro ( $1 \mu\text{m} = 10^4 \text{ \AA} = 10^{-3} \text{ mm}$ ). El límite de esta técnica se presenta cuando el tamaño de partícula se aproxima a la longitud de onda visible de 0,4 a 0,7  $\mu\text{m}$ . Por lo que para tamaños submicrónicos es necesario el uso de microscopios electrónicos.

#### *Condiciones del ensayo*

Para el estudio de la muestra se ha utilizado un microscopio óptico H-P1 (Carl Zeiss, Alemania). Este equipo tiene acoplado una cámara fotográfica, que registra las imágenes directamente a un ordenador. Antes de ser observadas al microscopio óptico las muestras fueron pulidas (véase sección III.2.2. *Condiciones del estudio*).



### III.2.2. Microscopía electrónica de barrido emisión de campo (MEB-EC-EDS)

La microscopía electrónica ofrece una mayor resolución, ampliación, profundidad de campo, y en general, mayor versatilidad que los microscopios ópticos.

El microscopio de barrido se utiliza principalmente para estudiar la superficie o la estructura cercana a la superficie de muestras gruesas.

El haz de electrones pasa a través de las lentes condensadoras y de objetivos, y es barrido a lo largo de la muestra por las bobinas de barrido, mientras que un detector cuenta el número de electrones secundarios de baja energía emitidos por cada punto de la superficie. Al mismo tiempo se utiliza el foco de un tubo de rayos catódicos (TRC) para proporcionar contraste a la imagen. Tanto el haz de electrones que proviene del detector como el foco son barridos de forma similar a la de un receptor de televisión dando lugar a la imagen ampliada. El mecanismo de ampliación es bastante simple y es importante notar que en este tipo de microscopio no existen lentes proyectoras [10].

El voltaje de aceleración de un microscopio electrónico de barrido se encuentra entre 2 keV y 40 keV, y su resolución entre 50 y 20 Å.

#### *Condiciones del estudio*

Dependiendo del estudio que se vaya a realizar las muestras fueron sometidas a un proceso de pulido antes de ser observadas al microscopio. Los diferentes pasos realizados se detallan a continuación:

**Embutido:** las muestras a estudiar se embutieron en una mezcla de resina epoxy de fraguado a temperatura ambiente, con una relación en volumen 8:1 (Epofix Resin (EPOES) y endurecedor Epofix (EPOAR)). En algunos casos fue necesario realizar vacío para permitir que la mezcla penetrara la muestra y evitar así el desprendimiento de parte del material durante las sucesivas etapas de pulido.

**Desbastado:** para esta etapa se utilizó una pulidora automática Phoenix 4000 (Buehler, EEUU). Esta etapa se inicia con el desbastado grueso en un disco de 600 µm y finaliza con el uso de lijas de SiC P2500, utilizando como lubricante agua, ya que las muestras a estudiar no se hidratan. Con el fin de favorecer el desbastado el brazo giratorio de la pulidora y el paño de desbastado giran en distinto sentido. Las condiciones generales fueron: presión de 3 psi, fuerza individualizada y 200 rpm de velocidad.

**Pulido:** las muestras fueron pulidas en el mismo equipo donde se realizó el desbastado. Para esta etapa se utilizaron paños especiales, a los cuales se añadieron unas gotas de una suspensión acuosa de óxido de cerio. En algunos casos fue necesario pulir antes con suspensiones en aceite de diamante de 6, 3 y 1  $\mu\text{m}$  en forma de spray. Las condiciones generales fueron: presión de 0 psi, fuerza individualizada y 100 rpm de velocidad.

Para su estudio por MEB las superficies de las muestras fueron recubiertas con plata, el equipo utilizado fue un MEB de Emisión de Campo (MEB-EC) Hitachi-S4700 (Tokio, Japón), con un espectrómetro de dispersión de energía de rayos X. Las muestras fueron analizadas usando el Sistema Noran Six-Thermo Electron Corporation EDS (Waltham, MA).

### **III.2.3. Microscopía electrónica de transmisión y difracción de un área seleccionada (MET-DAS)**

En muchos aspectos, esta técnica se asemeja a la MEB, con la diferencia de que en MET; los electrones transmitidos inelásticamente son empleados para la formación de la imagen del material que se desea analizar. Para el análisis elemental, también se emplea una microsonda EDS, que analiza las emisiones de rayos X con energía y longitud de onda característicos de los elementos de la muestra [10].

Mediante el equipo MET se realizaron experimentos de difracción de electrones, según la técnica de difracción de un área seleccionada (DAS), que consiste en realizar la difracción electrónica en un área determinada y seleccionada de la muestra visualizada en el microscopio lo que permite estudiar su estructura atómica [11;12].

#### *Condiciones del estudio*

El estudio se realizó en un microscopio analítico de transmisión Jeol, modelo 2010-200 keV. Este microscopio está equipado con un espectrómetro analítico para el análisis de los rayos X emitidos por la muestra (EDS). Igualmente, está provisto de un equipo para realizar difracción de electrones de un área seleccionada (DAS).

Al microscopio MET se estudiaron muestras sólidas y en polvo. En esta sección se describe la preparación de las muestras sólidas, mientras que las muestras en polvo se describirán en la sección III.7.

Las muestras sólidas se procesaron en dos etapas: (a) pulido y adelgazamiento mecánico convencional hasta espesor del orden de 50  $\mu\text{m}$ ; (b) adelgazamiento por bombardeo iónico: en esta etapa las muestras fueron colocadas en soportes huecos de Ni (diámetro del hueco 600  $\mu\text{m}$ - G2660N Agar). Posteriormente, se procedió al adelgazamiento mediante un sistema de pulido iónico de precisión (GATAN modelo 691), utilizando un haz de iones de Ar de 5 keV de energía incidiendo en ambas caras de la muestra con un ángulo de  $15^\circ$ . El espesor final de la muestra fue menor a 0,5  $\mu\text{m}$ .

Finalmente, las muestras se recubrieron con grafito para facilitar su estudio al MET.

#### **III.2.4. Microanálisis en microscopía electrónica**

La dispersión de energías de rayos X (Energy-Dispersive-Spectroscopy en inglés, EDS) es una técnica espectroscópica micro-analítica que se basa en el estudio de las interacciones entre la radiación electromagnética y la materia. Su capacidad de caracterización se debe, en gran parte, al principio fundamental de que cada elemento tiene una estructura atómica única que emite rayos X que son característicos de su estructura atómica.

Esta técnica utiliza el espectro característico de rayos X emitido por la muestra después de su excitación por electrones de alta energía para obtener información sobre su composición elemental y puede analizar muestras muy pequeñas o estudiar áreas muy pequeñas de muestras mayores.

En un espectro de rayos X, la medida de la longitud de onda o de la energía, permite determinar los elementos que están presentes en la muestra, es decir realizar un análisis cualitativo. La medida de la cantidad de rayos X emitidos por segundo permite realizar un análisis cuantitativo [13].

De los diferentes tipos de microscopios, que se utilizan comúnmente para microanálisis, en la presente tesis se han usado: microscopios electrónicos de barrido con detectores de rayos X y un microscopio de transmisión con detectores de rayos X.

### III.3. Estudio estructural

#### III.3.1. Resonancia magnética nuclear (RMN)

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) estudia las interacciones entre los momentos magnéticos dipolares de determinados núcleos atómicos bajo la acción de un campo magnético aplicado externamente ( $B_0$ ). Los núcleos atómicos que se pueden estudiar mediante RMN son aquellos que poseen un número spin nuclear ( $I$ ) distinto de cero y, por lo tanto, posee un momento de dipolo magnético permanente ( $\mu$ ) definido por:

$$\mu = \gamma P \quad (\text{III.3})$$

donde  $\gamma$  es la razón giro-magnética característica del núcleo en estudio y  $P$  su momento angular [14].

El campo magnético aplicado ( $B_0$ ), produce un desdoblamiento de los niveles energéticos (efecto Zeeman), donde el momento magnético  $\mu$  sólo puede tomar determinadas orientaciones, de forma paralela o antiparalela  $B_0$  [15].

Para una alineación lo más paralelamente posible a  $B_0$ , la orientación de  $\mu$  es la de más baja energía. El exceso de núcleos en el nivel de más baja energía, genera una magnetización neta  $M_0$ , que en el equilibrio tendrá la misma dirección y sentido que  $B_0$  y es proporcional al número de átomos activos en RMN. Por lo tanto, la aplicación a un material de una energía capaz de promover la transición en los niveles de energía y de modificar la orientación, permite generar un espectro en el cual, la intensidad, forma y posición de las señales de un núcleo determinado están íntimamente relacionadas con su estructura atómica y/o molecular. Para esto, la frecuencia de la radiación aplicada debe someter a  $\mu$  a un par de fuerzas le obliguen a girar alrededor del campo con un movimiento conocido como precesión de Larmor, con una frecuencia  $\nu_0$  proporcional a  $B_0$  a través de la ecuación:

$$\nu_0 = (\gamma/2\pi) B_0 \quad (\text{III.4})$$

Dependiendo de la distribución de los electrones y de los enlaces químicos que rodean al núcleo, los campos magnéticos de los átomos al interaccionar con los distintos momentos magnéticos modificarán los niveles de energía, generando desvíos en la posición y forma de las líneas del espectro de RMN, debido al apantallamiento electrónico del núcleo. Este comportamiento se denomina desplazamiento químico ( $\delta$ ), que se calcula en partes por millón (ppm) respecto a la posición de la línea de un compuesto tomado como referencia.

El desplazamiento químico está asociado a una frecuencia de resonancia característica para cada átomo y su entorno (lo que permite identificar los átomos en un sólido y su entorno); viene dado por:

$$\delta = (\nu - \nu_{ref} / \nu_{ref}) 10^6 ppm \quad (III.5)$$

siendo  $\nu$  y  $\nu_{ref}$  las frecuencias de resonancia del núcleo y de la referencia frente a la que se realiza el experimento, respectivamente [14].

### *RMN-Rotación al ángulo mágico*

La interacción dipolar entre espines nucleares vecinos y la interacción cuadrupolar con gradientes del campo magnético son otras interacciones, además de las Zeeman y desplazamiento químico, a partir de las cuales se puede obtener información acerca de la geometría estructural.

La presencia de estas interacciones, en estado sólido, producen fuertes ensanchamientos de las líneas de resonancia y los espectros resultantes son difíciles de resolver. En estado líquido, los movimientos moleculares son suficientemente rápidos como para promediar las interacciones anisótropas internas y los espectros de RMN muestran bandas de resonancia estrechas. En los sólidos estas interacciones anisótropas no son promediadas por el movimiento y la parte espacial de estas interacciones depende de todas las orientaciones presentes, dando lugar a espectros cuyas líneas resultan de la superposición de todas las contribuciones posibles y presentan ensanchamientos inhomogéneos.

El uso de la rotación al ángulo mágico (MAS) [16-23] permite eliminar las interacciones anisótropas de primer orden ya que la parte del Hamiltoniano pasa a ser independiente del tiempo. Para la adquisición del espectro la muestra es introducida en un rotor y es rotada con un ángulo de inclinación de 54,74° con respecto al campo magnético aplicado, dando lugar a bandas estrechas centradas en las posiciones de desplazamiento químico isótropo.

### *Condiciones del ensayo*

En la presente tesis se ha caracterizado por RMN-MAS el vidrio obtenido, mediante el estudio de los espectros RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  y de  $^{31}\text{P}$ . Para esto el vidrio fue molido en un molino de WC hasta un tamaño menor a 63  $\mu\text{m}$ .

Los espectros de resonancia magnética nuclear de alta resolución (RMN-MAS) de  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  de las muestras en polvo se obtuvieron con un espectrómetro Bruker Avance400 a un campo magnético de 9,4 Tesla. Esto corresponde a las frecuencias de 79,49 y 161,98 MHz para  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ , respectivamente. Se usaron velocidades de rotación de la muestra de 10 kHz. Los espectros se registraron mediante secuencias de pulso sencillo. En el caso de  $^{29}\text{Si}$  se realizaron 800 acumulaciones a 5  $\mu\text{s}$  (duración del pulso de  $\pi/2$ ) y tiempos de repetición de 5s. En el caso del  $^{31}\text{P}$  se adquirieron 100 acumulaciones con pulsos de 6  $\mu\text{s}$  y tiempos de repetición de 5s. Los desplazamientos químicos de  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$  se midieron utilizando estándares externos de tetrametilsilano (TMS) y  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) respectivamente.

Las deconvoluciones de los espectros RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  se llevaron a cabo mediante el programa WINFIT (Bruker).

## **III.4.Técnicas de análisis térmico**

### **III.4.1.Dilatometría**

La dilatación que experimenta un material por acción del calor es una consecuencia del incremento energético, lo que trae consigo un aumento de las vibraciones atómicas, fenómeno que se traduce en un incremento dimensional del material. Este aumento, dependiente de la temperatura, es característico de cada material, denominado coeficiente de dilatación. La técnica que estudia esta propiedad se denomina dilatometría [24].

#### *Fundamentos de la dilatometría*

Cuando se calienta un material de tal forma que haya un cambio en la temperatura, de  $T_1$  a  $T_2$  ( $\Delta T$ ), se produce un cambio de longitud, de  $L_0$  a  $L_1$  ( $\Delta L$ ). Para describir este cambio se define el coeficiente de expansión térmica lineal como:

$$\alpha = \frac{\Delta L}{L_0} \cdot \Delta T^{-1} \quad (\text{III.6})$$

Como el coeficiente de dilatación depende de la temperatura, su valor real a una temperatura determinada se calcula en función de la pendiente de la curva de dilatación térmica en ese punto.

Para los vidrios, cuerpos isótropos, los coeficientes de dilatación son iguales en las tres direcciones.

La variación dimensional de un vidrio en función de la temperatura ocurre de un modo lineal hasta que se produzcan transformaciones fisicoquímicas (cambios de estructura, puntos de transición vítrea, cristalización o desvitrificación, etc)

#### *Condiciones del ensayo*

Se cortó una probeta del vidrio colado ( $10 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ ), y el análisis dilatométrico se realizó con una velocidad de calentamiento de  $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$  (Dilatómetro Netzsch, Alemania). Mediante este ensayo se determinaron las siguientes propiedades térmicas: temperatura de transición del vidrio ( $T_g$ ), temperatura de reblandecimiento ( $T_r$ ) y el coeficiente de expansión térmica ( $\alpha$ ).

#### **III.4.2. Análisis térmico diferencial (ATD)**

El estudio de las transformaciones energéticas que experimenta una muestra cuando se calienta a una determinada velocidad se llevó a cabo mediante la técnica de análisis térmico diferencial (ATD). Esta técnica, es fundamental para conocer el rango de temperaturas en que tiene lugar la desvitrificación de un vidrio, así como las temperaturas de transformación de fase [24].

El ATD es una técnica en la que se mide la diferencia de temperatura entre una sustancia problema y un material de referencia en función de la temperatura; cuando ambos materiales se someten, al mismo tiempo y en igual grado, a un programa de temperatura controlado de calentamiento o enfriamiento. Las diferencias de temperatura entre la muestra y el material de referencia se deben a los procesos exotérmicos o endotérmicos que tienen lugar en ella, la tabla III.1 muestra alguno de ellos.

**Tabla III.1.**

*Procesos endotérmicos y exotérmicos que pueden estudiarse mediante ATD [24].*

Procesos	Endotérmicos	Exotérmicos
Transición cristalina	X	X
Fusión	X	
Transición de vidrio	Cambio en línea base	

La medida de la diferencia de temperatura ( $\Delta T$ ) se realiza con tres termopares, dos de ellos colocados en contacto con los crisoles donde se sitúan las muestras y conectados en oposición; y un tercero que permite la medida de la temperatura

#### *Condiciones del ensayo*

Los ensayos de ATD fueron realizados en un instrumento SETARAM, modelo Setsys Evolution 1750, a una velocidad de calentamiento entre  $2 - 20 \text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ; y con corriente de aire. Las muestras estudiadas, en polvo o en masa, fueron colocadas en un crisol de platino. Las muestras en polvo corresponden a un tamaño pasante  $63 \text{ }\mu\text{m}$ . El material de referencia o inerte fue una alúmina ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) calcinada. Las muestras en masa fueron obtenidas mediante el uso de una microcortadora o utilizando una broca de  $5 \text{ mm}$  de diámetro.

#### **III.4.3. Microscopía de calefacción**

La microscopía de calefacción permite la observación de las variaciones morfológicas y dimensionales que sufre una muestra de material al ser calentada, pudiéndose determinar los intervalos de temperatura en los que se produce la contracción, expansión y fusión del material en estudio [24].

#### *Condiciones del estudio*

El equipo utilizado ha sido un microscopio de calefacción-dilatómetro óptico modelo Leica HR 18-Hesse Instruments cuya temperatura máxima de trabajo es de  $1700^{\circ}\text{C}$ . Durante estos ensayos se trabajó en atmósfera de aire. La velocidad de trabajo fue constante ( $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ). Las muestras estudiadas fueron en polvo y sólidas. Para las primeras se molió el vidrio hasta un tamaño menor a  $63 \text{ }\mu\text{m}$ ; y posteriormente se prensaron para obtener una muestra prismática, cuyo diámetro máximo fue de  $2 \text{ mm}$  y altura de  $4 \text{ mm}$ . Para obtener las



muestras sólidas fue necesario cortar el vidrio en una microcortadora con disco de diamante para obtener las dimensiones antes descritas.

### **III.5. Técnicas de análisis mecánico**

Parte de los materiales obtenidos en el presente trabajo fueron caracterizados mecánicamente; estudiándose las siguientes propiedades: módulo de elasticidad, microdureza Vickers, resistencia a la fractura y tenacidad.

#### **III.5.1. Módulo de elasticidad**

Un cuerpo sometido a una fuerza, sufre una deformación, que si al cesar tal fuerza recupera su forma original se dice que presenta un comportamiento elástico, mientras que, si el cambio de forma se mantiene de modo permanente, se dice que su comportamiento es plástico.

Los materiales elásticos cumplen la ley de Hooke, que establece que, cuando se produce una deformación elástica en un material por efecto de una tensión ( $\sigma$ ), esta será proporcional a la deformación experimental ( $\varepsilon$ ):

$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (\text{III.7})$$

siendo  $E$  un factor de proporcionalidad característico de cada material, que recibe el nombre de, módulo de elasticidad o módulo de Young. Cuanto más elástico sea un material, es decir, cuanto mayor sea la deformación que pueda sufrir; menor es el valor de  $E$ .

Existen dos ensayos para determinar el módulo de elasticidad, estos son: dinámico y estático, el primero se basa en la medida de la frecuencia de resonancia del material para calcular el módulo de elasticidad mientras que en el segundo, el módulo se calcula a partir de la pendiente de la zona elástica de la curva obtenida al representar la tensión frente a la deformación, utilizando la ecuación III.7.

### Ensayo dinámico

Para este ensayo se utilizó una técnica de resonancia que se basa en la determinación de la frecuencia propia de vibración. El período de vibración ( $T$ ) del material está relacionado con el módulo de Young mediante constantes de proporcionalidad; una dependiente de la masa ( $M$ ) y otra de la geometría de la muestra ( $C$ ):

$$E = f(C \bullet M \bullet v^2) \quad (\text{III.8})$$

La expresión matemática que relaciona estas variables y proporciona el valor de  $E$  viene dada por:

$$E = 0,94642 \cdot 10^{-8} \cdot \frac{m \cdot A \cdot F^2}{B} \cdot \left(\frac{L}{W}\right)^3 \quad (\text{III.9})$$

donde  $m$  es la masa (en g),  $L$  el largo,  $W$  la altura y  $B$  la anchura de la probeta (todas las longitudes en mm),  $v$  el coeficiente de Poisson,  $F$  la frecuencia de resonancia (en Hz) y  $A$  la función:

$$A = 1 + 6,685 (1 + 0,0752v + 0,8109v^2) \cdot \left(\frac{W}{L}\right)^2 - 0,868 \cdot \left(\frac{W}{L}\right)^4 \cdot \frac{8,34 \cdot (1 + 0,2023v + 2,173v^2) \cdot \left(\frac{W}{L}\right)^4}{1 + 6,338 (1 + 0,1408v + 1,536v^2) \cdot \left(\frac{W}{L}\right)^2} \quad (\text{III.10})$$

### Condiciones del ensayo dinámico

Para la determinación del módulo elástico dinámico se prepararon muestras prismáticas rectangulares ( $4,5 \times 5 \times 54 \text{ mm}^3$ ) mediante corte de los materiales obtenidos.

El instrumento empleado para este ensayo fue un Grindosonic MK5 “Industrial”, para este estudio la muestra se coloca en el portamuestra teniendo en cuenta que la distancia entre los apoyos debe ser de  $0,224 L$ , siendo  $L$  el largo de la probeta. Mediante un precursor o martillo, se induce la excitación mecánica externa que provoca una vibración, un micrófono acústico amplifica la señal que es detectada por un piezoeléctrico.

El tratamiento de datos se realizó con ayuda de un programa informático (EMOD), el cual determina el módulo dinámico de Young; introduciendo las características de las muestras (dimensiones y densidad), el valor de la frecuencia de resonancia ( $\mu\text{s}$ ) y el coeficiente de Poisson ( $\mu = 0,25$ ). La relación entre lo leído por el aparato y la frecuencia es la siguiente:

$$F=2000000/R \quad (III.11)$$

donde  $R$  es la lectura en  $\mu s$  y  $F$  la frecuencia en Hz.

Las ecuaciones III.9 y III.10 permiten relacionar todas las variables mencionadas anteriormente, proporcionando así el valor de  $E$ .

#### *Ensayo estático*

En este ensayo se determina la curva tensión-deformación, donde la pendiente corresponde al valor del módulo de elasticidad o módulo de Young. Se ha usado el ensayo de flexión en tres puntos.

#### *Condiciones del ensayo estático*

Se ensayaron probetas con las mismas dimensiones que para el ensayo dinámico. El instrumento de medida fue una INSTRON Serie IX modelo 4411, con una célula de carga de 5 KgN, una velocidad de aplicación de la carga de  $0,5 \text{ mm min}^{-1}$  y una distancia entre apoyos de 30 mm.

Los datos que proporciona el equipo son la carga ( $F$ ) frente al desplazamiento ( $D$ ). Mediante la ecuación III.12. se puede calcular la deformación ( $\epsilon$ ), donde  $D$  es el desplazamiento (mm),  $a$  el espesor de la probeta (mm) y  $L$  la distancia entre apoyos (mm):

$$\epsilon = \frac{6 \cdot D \cdot a}{L^2} \quad (III.12)$$

Al representar la curva  $\sigma$  con respecto a  $\epsilon$  y su posterior ajuste por mínimos cuadrados, se obtiene la pendiente de la curva que representa el módulo de elasticidad estático.

### **III.5.2.Resistencia a la fractura**

La resistencia a la fractura viene determinada por la tensión necesaria para propagar los defectos existentes en los materiales, existe un gran número de ensayos para su determinación siendo los de tracción y flexión los más utilizados. En nuestro caso, al tratarse de materiales cerámicos, se empleó el método de flexión en tres puntos.

### *Condiciones del ensayo*

Las condiciones de este ensayo son las mismas que para la determinación del módulo elástico estático (véase sección III.5.1. *Condiciones del ensayo estático*). Para calcular el módulo de rotura (MOR), se utilizó la siguiente ecuación:

$$\sigma_f = \frac{3 \cdot L \cdot q}{2 \cdot b \cdot a^2} \quad (\text{III.13})$$

donde  $\sigma_f$  es el módulo de rotura,  $q$  es la carga máxima (N),  $b$  es la anchura de la probeta y  $a$  el espesor (dimensiones en mm).

### **III.5.3.Dureza Vickers**

La dureza, característica importante en un material, es un parámetro fácil de obtener por indentación [25]. Para lo cual se requieren probetas perfectamente plano paralelas con la superficie pulida.

### *Condiciones del ensayo*

Las medidas se realizaron mediante la indentación de la superficie pulida con ayuda de un microdurómetro automático Matsuzawa Seiki Co., Ltd modelo MXT50. El indenter utilizado fue una pirámide de diamante de base cuadrada, cuyo ángulo entre las caras ( $2\Psi$ ) es de  $136^\circ$ . La observación y la medida de la diagonal ( $D$  ó  $2a$ ) de la huella plástica residual permite expresar la dureza como:

$$H_V = \frac{1,854 \cdot P}{D^2} \quad (\text{III.14})$$

donde  $P$  es la carga ejercida sobre la punta del indenter durante el ensayo (en newtons) y  $D$  en mm.

La carga usada fue de 1 kg, durante 5 sg.

### III.5.4.Tenacidad

Una de las propiedades macroscópicas que caracteriza la fragilidad de un material cerámico es la tenacidad a la fractura ( $K_{IC}$ ).

La tenacidad a la fractura describe la facilidad con la cual se propaga una grieta o defecto en un material. Como se requiere procedimientos muy laboriosos, para probetas de vidrios y vitrocerámicos, para la determinación de la tenacidad por el método de flexión de tres puntos, se recurrió a su cálculo mediante indentación.

Distintos autores proponen diversas fórmulas para la medida de la tenacidad por indentación [26]. En el presente trabajo se utilizó la siguiente fórmula:

$$K_{IC} = 0,046 \cdot \left(\frac{c}{a}\right)^{-1,82} \cdot \left(\frac{E}{H}\right)^{0,4} \cdot H \sqrt{a} \quad (\text{III.15})$$

siendo ( $c$ ) y ( $a$ ) la mitad de las diagonales mayor y menor de la huella de indentación obtenida con pirámide Vickers; ( $H$ ) es la dureza Vickers y ( $E$ ) es el módulo de Young.

#### *Condiciones del ensayo*

Las mismas que para la dureza Vickers.

## III.6.Técnicas de análisis químico

### III.6.1.Fluorescencia de rayos X (FRX)

La fluorescencia de rayos X (FRX) es una técnica que utiliza la emisión secundaria o fluorescente de radiación X generada al excitar una muestra con una fuente de radiación de rayos X. La radiación primaria expulsa electrones de capas interiores del átomo. Los electrones de capas más externas ocupan los lugares vacantes, y el exceso resultante de esta transición se disipa en forma de fotones, radiación X fluorescente o secundaria, con una longitud de onda característica que depende del gradiente energético entre los orbitales electrónicos implicados, y una intensidad directamente relacionada con la concentración del elemento en la muestra [13].

Mediante esta técnica se ha realizado el análisis químico: de las materias primas usadas en la preparación del vidrio. Además se ha usado para estudiar la composición final del vidrio

y del vitrocerámico obtenido, estos últimos con el fin de determinar si se mantenía la composición de partida.

#### *Condiciones del ensayo*

El análisis se ha llevado a cabo utilizando un espectrofotómetro MagiX PW 2424 (Philips, Holanda) con un tubo de rayos X de rodio. El espectrómetro está equipado con el software analítico IQ<sup>+</sup> para el análisis cualitativo y semicuantitativo. Las curvas de calibración fueron obtenidas de patrones certificados de fosfatos de calcio y silicatos de calcio.

Las muestras se prepararon en forma de perla, fundiendo en una perladora automática Perl'x2 (Philips, Holanda); y en un crisol de Pt-Au: 0,3 g de muestra y 5,5 g de Li<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>.

#### **III.6.2. Análisis por espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)**

La espectrometría de emisión óptica de plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES) se fundamenta en la vaporización, disociación, ionización y excitación de los diferentes elementos químicos de una muestra en el interior de un plasma [13].

Durante el proceso de desexcitación de los átomos, neutros e iones en el interior de un plasma, se producen emisiones de radiación electromagnética en la zona del UV-visble, estas radiaciones, que son características de cada elemento, se separan en función de su longitud de onda y con una intensidad. La identificación de la longitud de onda permite determinar cualitativamente el elemento, mientras que la intensidad de la radiación emitida proporciona información que permite cuantificar [13].

Esta técnica se utilizó para determinar las variaciones en los elementos Ca, Si y P en el Suero Fisiológico Artificial (SFA), ensayos que se explicaran en el siguiente apartado.

#### *Condiciones de estudio*

Este estudio se realizó empleando un equipo de análisis multielemental de la casa Termo Jarrell Ash, modelo IRIS ADVANTAGE, con sistema de visualización axial y óptica auxiliar para una visión radial, utiliza una fuente de radiofrecuencia de 40,68 MHz y posee una red de difracción de tipo Echelle, dispersión cruzada por prisma y un único mecanismo de inyección de carga (CID) como detector de estado sólido.

### III.7. Ensayos de Bioactividad *in vitro* en Suero Fisiológico Artificial (SFA)

Los implantes bioactivos deben reaccionar químicamente con los fluidos del cuerpo de manera compatible con el proceso de reparación del tejido duro. Cuando el material bioactivo es implantado, primero se forma sobre la superficie del mismo una capa amorfa de fosfato de calcio (a-CaP) [27-36]. Esta capa cristaliza como una carbohidroxiapatita (CHA) análoga a la presente en el hueso, ver introducción (capítulo I).

Entonces, el objetivo de este ensayo de reactividad es evaluar la variación en composición del Suero Fisiológico Artificial (SFA) al suspender el material dentro del mismo, como consecuencia de los fenómenos de disolución-precipitación, así como los cambios estructurales producidos en los materiales.

Para la presente investigación se ha elegido como formulación del SFA la propuesta por Kokubo y col. en 1991 (tabla III.2.), donde establecen una corrección del SFA establecido en 1990, al añadir  $\text{SO}_4^{2-}$ , iones que están presentes en el plasma de sangre humano [37].

**Tabla III. 2.**

*Concentración iónica del SFA y del plasma sanguíneo.*

	Concentración Iónica (mM)							
	$\text{Na}^+$	$\text{K}^+$	$\text{Mg}^{2+}$	$\text{Ca}^{2+}$	$\text{Cl}^-$	$\text{HCO}_3^-$	$\text{HPO}_4^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$
<b>SFA</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	147,8	4,2	1,0	0,5
<b>Plasma Sanguíneo</b>	142,0	5,0	1,5	2,5	103,0	27,0	1,0	0,5

La preparación del SFA se ha llevado a cabo mediante el procedimiento establecido por Kokubo [37], el cual se describe a continuación:

- 1) Se colocaron 700 ml de agua destilada en un recipiente de plástico de 1000 mL previamente lavado con detergente neutro y con HCl 1M.
- 2) Se calentó el agua destilada hasta 36,5 °C en baño de agua con un agitador magnético.
- 3) Se añadieron los reactivos uno a uno, el orden y las cantidades se muestran en la tabla III.3. Se disolvió completamente el reactivo antes de agregar otro.

**Tabla III.3.**  
*Reactivos, orden y cantidades usadas para preparar 1000 mL de SFA*

Orden	Reactivo	Cantidad
1	Cloruro de sodio (NaCl)	8,035 g
2	Carbonato ácido de sódio (bicarbonato sódico)(NaHCO <sub>3</sub> )	0,355 g
3	Cloruro de potasio (KCl)	0,225 g
4	Fosfato ácido de potasio trihidratado (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·3H <sub>2</sub> O)	0,231 g
5	Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O)	0,311 g
6	1 M (mol/L) Ácido clorhídrico (1M-HCl)	39 mL
7	Cloruro de calcio (CaCl <sub>2</sub> )	0,292 g
8	Sulfato de Sódio Anhidro (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	0,072 g
9	Tris hidroximetil aminometano ((HOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub> ) (Tris)	6,118 g
10	1 M (mol/L) Ácido clorhídrico (1M-HCl)	0 - 5 mL

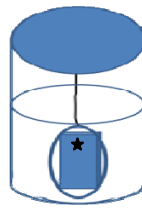
- 4) Se midió el pH a 36,5 °C. Después de añadir el Tris el pH debe ser igual a 7,45  $\pm$  0,01.
- 5) Se agregaron gotas de 1M HCl hasta bajar el pH a 7,40  $\pm$  0,01 a 36,5 °C.
- 6) Se trasvasó a un matraz aforado de 1000 ml y se enrasó con agua destilada.
- 7) Finalmente, se trasvasó a un frasco de polietileno limpio y seco.
- 8) Se midió el pH a 36,5 °C, se reajustó el pH a 7,40  $\pm$  0,01.
- 9) El SFA preparado se mantuvo en un refrigerador entre 5 y 10 °C. El SFA se utilizó dentro de los 30 días de preparación.

Las muestras de material fueron colocadas en un soporte de plástico y luego en un recipiente de plástico conteniendo SFA, el volumen de SFA ha sido calculado siguiendo la ecuación:



$$V_s = \frac{S_a}{10} \quad (\text{III.16})$$

donde  $V_s$  es el volumen de SFA en ml y  $S_a$  es el área superficial aparente en  $\text{mm}^2$ . El volumen de SFA usado ha sido cercano a 15 ml. La figura 3.2. muestra el montaje del experimento.



**Figura 3.2.** *Diseño experimental para los ensayos in vitro en SFA. La zona indicada (★) ha sido la superficie estudiada.*

Los días de exposición al SFA estudiados fueron 3, 7, 14 y 21. Después de estos períodos las muestras se retiraron del SFA, se lavaron con agua destilada y acetona y se mantuvieron en un desecador hasta el momento del estudio superficial.

Los elementos presentes en el SFA se determinaron para los diferentes días de estudio por análisis ICP-OES. Para cada día de estudio se determinaron los cambios en el pH mediante un transistor de efecto de campo Hanna-HI4212 (Bedfordshire,UK).

La superficie de las muestras, después de su inmersión en SFA, se recubrió con grafito y se estudió por MEB-EC-EDS. Las secciones transversales del vitrocerámico, obtenidas por corte con una microcortadora de baja velocidad (Buehler, Illinois, USA), fueron embutidas bajo vacío en una resina epoxi. Por último, se pulieron y se recubrieron con grafito para su estudio por MEB-EC-EDS.

Con el objetivo de estudiar con más detalle los cambios ocurridos en la superficie del vitrocerámico en contacto con el SFA, después de los diferentes tiempos de estudio se removió el producto formado sobre su superficie con una cuchilla de acero inoxidable. El polvo retirado se colocó en un mortero de ágata y se dispersó en alcohol etílico. Una gota

de la suspensión se colocó sobre una rejilla de cobre, cubierta con grafito, para caracterizar el polvo por MET-DAS-EDS (MET, Jeol Jem 2010 a 200KeV).

### **III.8.Ensayos de Biocompatibilidad *in vitro* en cultivos celulares**

Para estos ensayos se usaron células MG63, para la primera etapa de la investigación y células humanas de medula ósea (HBMC), para la segunda etapa de la investigación.

Las células HBMC fueron obtenidas desde un paciente, cumpliendo con las normas del comité ético del INEB.

#### *Expansión celular*

En esta etapa se busca la multiplicación de las células, para obtener suficiente cantidad de células para su posterior siembra.

Las células fueron cultivadas en frascos de 75 cm<sup>2</sup> conteniendo 10 mL de medio de cultivo ( $\alpha$ -medio esencial mínimo ( $\alpha$ -MEM) (Gibco), 10% suero bovino fetal (Gibco), 1 % v/v fungizona (Gibco), 1 % v/v penicilina/estreptomicina (Gibco)). Las células se mantuvieron a 37 °C en una atmosfera húmeda con 5 % CO<sub>2</sub> en aire. El medio fue cambiado cada tres días hasta alcanzar la confluencia, momento en el cual las células deben ser sub-cultivadas, con el fin de evitar la muerte celular.

Para el sub-cultivo, la monocapa de células fue lavada con una solución tamponada de fosfato (PBS) (Sigma) e incubada con solución de tripsina/EDTA (0,25% tripsina, 1nM EDTA; Sigma) durante 5 min a 37°C para despegar las células del frasco de cultivo.

Para inhibir el efecto de la tripsina se añadió medio de cultivo a temperatura ambiente. Las células fueron sub-cultivadas dos veces, para obtener así la cantidad de células requeridas para el ensayo.

#### *Siembra de las células*

Las muestras estudiadas (vidrio o vitrocerámico) fueron esterilizadas (120°C, 20min), y colocadas en platos de cultivos de 24 pozos no tratados, para evitar la adhesión celular en el fondo. Las células fueron sembradas sobre el material con una concentración de 5 x 10<sup>4</sup> células por pozo y luego se añadió 500 ml de medio de cultivo fresco (complementado

con vitamina C, dexametasona y  $\beta$ -glicerolfosfato), se mantuvieron en la incubadora a 37 °C durante 4 h para permitir la adhesión celular. Después, se añadió medio fresco hasta alcanzar un volumen de 2 ml por pozo.

Las células fueron cultivadas sobre las muestras de vidrio por períodos de 3 y 7 días. Para cada tiempo estudiado se evaluó la adhesión, distribución y morfología celular, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB).

Para el estudio del vitrocerámico se realizó un estudio más completo, para esto las células fueron cultivadas por períodos de 1, 3, 7, 14 días. Para cada tiempo de estudio se evaluó la adhesión, distribución y morfología celular, mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía confocal de barrido láser (MCBL). Además, utilizando el ensayo de proteína se realizó una cuantificación celular. Para el ensayo de MEB se realizó un control negativo usando portaobjetos de vidrio, mientras que para los ensayos de proteína se usó un control positivo mediante el uso de placas con pozos de poliestireno.

### **III.8.1. Microscopio Electrónico de Barrido (MEB)**

Las muestras biológicas son por lo general tejidos blandos que poseen un alto contenido de agua, y son muy sensibles a los cambios de presión generados por el MEB. Debido a esto, la preparación de las muestras, en el caso de sistemas biológicos, necesita una serie de pasos especiales, como la fijación de las células, los lavados, la deshidratación, el secado, el recubrimiento con oro y finalmente la observación.

Antes de ser observadas al MEB, las muestras fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con 1,5% v/v de glutaraldehído en 0,14M cacodilato de sodio (pH 7,4) durante 30 min, a temperatura ambiente. La deshidratación de la muestra fue realizada mediante la inmersión consecutiva en una serie de soluciones diluidas de etanol de 50, 70, 80, 90, 99 y 100% (v/v).

El secado de las muestras se realizó usando el método de punto crítico, el cual permite pasar del estado líquido al gas seco, sin causar efectos nocivos en la muestra; debidos principalmente a los efectos de la tensión superficial, por lo que es una técnica adecuada para la deshidratación de especímenes biológicos, los cuales son muy delicados.

### **III.8.2. Microscopio Confocal de Barrido Láser (MCBL)**

Las muestras del vitrocerámico fueron lavadas dos veces con PBS, las células fueron fijadas con formaldehído al 3,7 % (v/v), durante 10 min, seguidamente fueron permeabilizadas con tritón X-100 al 0,1 % (v/v) durante 5 min, posteriormente fueron incubadas en 10mg/mL de albumina suero bovino y 10ug/mL de RNase (ácido ribonucleico) durante 60 min a temperatura ambiente. Los filamentos de las células activas fueron teñidos con Alexafluor conjugado phalloidin (Molecular Probes) durante 20 min y los núcleos fueron contrastados con 10 mg/mL de yodo propidio (Sigma) durante 15min en la oscuridad.

Finalmente, las muestras fueron lavadas con PBS y cubiertas con Vectashield. Las imágenes de MCBL fueron adquiridas en un microscopio BioRad MRC 600, luego las imágenes fueron tratadas con un software de Leica.

### **III.8.3. Ensayo de Contenido de Proteína Total**

Se añadió 1% (v/v) de Tritón a cada pozo, luego se agitó suavemente el plato, seguidamente fue colocado durante 1 minuto en ultrasonidos, después se mezcló una alícuota de cada pozo con el reactivo de trabajo BCA (ácido bicinconínico), se homogenizó la mezcla y finalmente se determinó la absorbancia a 540 nm, se construyó una curva de calibrado, y se calculó el contenido de proteína por pozo.

## REFERENCIAS

- [1] S. Mascarós, "Difracción de rayos X," in *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. M. Faraldos and C. Goberna, Eds. Madrid,España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2003.
- [2] D. A. Skoog, F. J. Holler, and T. A. Nieman, *Principios de análisis instrumental* McGraw-Hill/Interamericana de España, 2001.
- [3] H. Fernandezmoran and A. Engstrom, "Electron Microscopy and X-Ray Diffraction of Bone," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 23, no. 2, pp. 260-264, 1957.
- [4] V. Esteve, *El método Rietveld*. Castellón, España: Universitat Jaume I, 2006.
- [5] R. A. Young, *The Rietveld Method* Oxford University Press, 1993, p. 336.
- [6] M. A. García Aranda, A. Cabeza, and A. G. De La Torre, "Fundamentos del método Rietveld," in *El método de Rietveld*. V. Esteve, Ed. Castelló de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I, 2006.
- [7] X. Alcobé, "Análisis cuantitativo de fases por difracción de rayos X de polvo por el método Rietveld. Aspectos prácticos y ejemplos," in *El método de Rietveld*. V. Esteve, Ed. Castelló de la Plana, España: Publicacions de la Universitat Jaume I, 2006.
- [8] A. G. De La Torre, S. Bruque, and M. A. G. Aranda, "Rietveld quantitative amorphous content analysis," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 34, pp. 196-202, 2001.
- [9] A. C. Larson and R. B. Von Dreele, "Los Alamos National Laboratory Report No. LA-UR-86-748," in *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos* 1994.
- [10] I. Díaz, A. Landa, and L. C. Otero-Díaz, "Microscopía electrónica de transmisión (TEM) y de barrido (SEM)," in *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. M. Faraldos and C. Goberna, Eds. Madrid,España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2003.
- [11] B. E. P. Beeston, R. W. Horne, and R. Markham, *Electron diffraction and optical diffraction techniques*, Glauert,A.M. ed. Amsterdam North-Holla: North-Holland Publishing Company, 1972.
- [12] S. K. Chapman, *Working with a Scanning Electron Microscope*. England: Lodgemark Press ltd., 1986.
- [13] M. Faraldos, "Análisis químico: espectroscopía de absorción y emisión atómica. Preparación de muestras. Análisis elemental," in *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. M. Faraldos and C. Goberna, Eds. Madrid,España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2003.
- [14] I. Sobrados, "Espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN)," in *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. M. Faraldos and C. Goberna, Eds. Madrid,España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2003.
- [15] I. N. Levine, *Química Cuántica*. Madrid,España: Prentice Hall, 1977.

- [16] E. R. Andrew, A. Bradbury, and R. G. Eades, "Nuclear magnetic resonance spectra from a crystal rotated at high speed," *Nature*, vol. 182, p. 1659, 1958.
- [17] E. R. Andrew, "Magic Angle Spinning," *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 1, p. 195, 1981.
- [18] I. Lowe, "Free induction decays of rotating solids," *J. Phys. Rev. Letters*, vol. 2, p. 285, 1959.
- [19] H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. Gonzalez, B. Leon, F. Malz, and C. Jager, "Raman and NMR study of bioactive Na<sub>2</sub>O-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, no. 45-46, pp. 5004-5008, 2008.
- [20] I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, and R. G. Hill, "Structural analysis of bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 351, no. 2, pp. 173-183, 2005.
- [21] P. G. Galliano, J. M. P. Lopez, E. L. Varet, I. Sobrados, and J. Sanz, "Analysis by Nuclear-Magnetic-Resonance and Raman Spectroscopies of the Structure of Bioactive Alkaline-Earth Silicophosphate Glasses," *Materials Research Bulletin*, vol. 29, no. 12, pp. 1297-1306, 1994.
- [22] T. Hoche, C. Moisesescu, I. Avramov, C. Russel, and W. D. Heerdegen, "Microstructure of SiO<sub>2</sub>-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-K<sub>2</sub>O-F- glass ceramics. 1. Needlelike versus isometric morphology of apatite crystals," *Chemistry of Materials*, vol. 13, no. 4, pp. 1312-1319, 2001.
- [23] R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, and L. M. Rodriguez-Lorenzo, "Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite," *Biomaterials*, vol. 26, no. 11, pp. 1317-1327, 2005.
- [24] E. Sastre and P. Ferreira, "Análisis térmico," in *Técnicas de análisis y caracterización de materiales*. M. Faraldos and C. Goberna, Eds. Madrid, España: Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 2003.
- [25] J. F. Navarro, *El vidrio*, 3 ed. Madrid, Spain: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. SECV, 2003, p. 270.
- [26] K. M. Liang, G. Orange, and G. Fantozzi, "Evaluation by Indentation of Fracture-Toughness of Ceramic Materials," *Journal of Materials Science*, vol. 25, no. 1A, pp. 207-214, 1990.
- [27] M. Cerruti and N. Sahai, *Silicate biomaterials for orthopaedic and dental implants*. Chantilly: Mineralogical Soc America, 2006, pp. 283-313.
- [28] P. N. De Aza, Z. B. Luklinska, M. R. Anseau, F. Guitian, and S. De Aza, "Bioactivity of pseudowollastonite in human saliva," *Journal of Dentistry*, vol. 27, no. 2, pp. 107-113, 1999.
- [29] P. N. De Aza, J. M. Fernandez-Pradas, and P. Serra, "In vitro bioactivity of laser ablation pseudowollastonite coating," *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 1983-1990, 2004.
- [30] P. N. Deaza, F. Guitian, A. Merlos, E. LoraTamayo, and S. Deaza, "Bioceramics - Simulated body fluid interfaces: pH and its influence of hydroxyapatite formation," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 399-402, 1996.

- [31] P. N. Deaza, F. Guitian, and S. Deaza, "Bioactivity of Wollastonite Ceramics - In-Vitro Evaluation," *Scripta Metallurgica et Materialia*, vol. 31, no. 8, pp. 1001-1005, 1994.
- [32] A. Hertz and I. J. Bruce, "Inorganic materials for bone repair or replacement applications," *Nanomedicine*, vol. 2, no. 6, pp. 899-918, 2007.
- [33] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Chemical-Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with A Simulated Body-Fluid," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 79-83, 1992.
- [34] C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Mechanism of Apatite Formation on Cao-Sio<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Glasses in A Simulated Body-Fluid," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 143, no. 1, pp. 84-92, 1992.
- [35] C. Ohtsuki, Y. Aoki, T. Kokubo, Y. Bando, M. Neo, and T. Nakamura, "Transmission Electron-Microscopic Observation of Glass-Ceramic A-W and Apatite Layer Formed on Its Surface in A Simulated Body-Fluid," *Journal of the Ceramic Society of Japan*, vol. 103, no. 5, pp. 449-454, 1995.
- [36] T. Tian, D. L. Jiang, J. X. Zhang, and Q. L. Lin, "Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method," *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 28, no. 1, pp. 57-63, 2008.
- [37] T. Kokubo and H. Takadama, "How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?," *Biomaterials*, vol. 27, no. 15, pp. 2907-2915, 2006.

**CAPÍTULO IV**  
**MATERIAS PRIMAS**





## **IV.MATERIAS PRIMAS**

Con el objetivo de obtener el vidrio de composición eutéctica se han usado materias primas comerciales y sintéticas. En el presente capítulo se presenta la caracterización de las mismas, principalmente desde un punto de vista químico, granulométrico y mineralógico, ya que la pureza en los materiales para aplicaciones biomédicas es un factor crítico, sabiendo que la presencia de altos contenidos de impurezas puede resultar en una respuesta celular indeseable. Mientras que las características morfológicas de las materias primas permiten establecer si existirá un adecuado proceso de fusión (velocidad de fusión) [1-5].

La caracterización de los materiales de partida se ha realizado utilizando diferentes técnicas, entre las más importantes están: DRX, para determinar las fases cristalinas presentes en los polvos; un analizador de dispersión de luz láser, para establecer la distribución de tamaño de partícula; la técnica de adsorción de N<sub>2</sub> usando la isoterma de BET, para determinar la superficie específica y fluorescencia de rayos X, para determinar la composición química.

### **IV.1.Sílice**

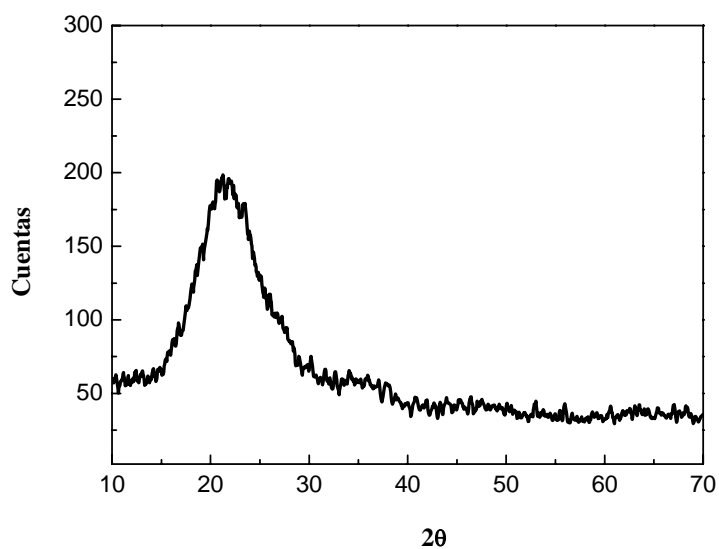
La sílice constituye una de las materias primas más importantes en la obtención de un vidrio, para obtener un vidrio de buena calidad se requiere un porcentaje de pureza mayor al 99,5 % [5;6]. En la tabla V.1 se muestra la composición química de la sílice usada en el presente trabajo. Es posible observar que presenta una alta pureza (99,8 %), y que la mayor impureza Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se encuentra dentro de los límites aceptables (0,11 % en peso) [5].

En la figura 4.1 se muestra el difractograma de DRX de la sílice empleada, en el que se observa un pico ancho (centrado en 2 $\theta$ : ~22°) característico de los materiales amorfos. El polvo de sílice presenta un tamaño medio de grano (D<sub>50</sub>) de 114  $\mu$ m, determinado por dispersión de luz láser.

**Tabla IV.1.**  
*Análisis químico de la sílice, obtenido mediante FRX*

Especie química	% en peso
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,11 (3)
CaO	0,015 (2)
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,028 (4)
K <sub>2</sub> O	0,015 (3)
Na <sub>2</sub> O	0,015 (2)
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,005 (1)
SO <sub>2</sub>	0,003 (1)
SiO <sub>2</sub>	99,8 (2)
TiO <sub>2</sub>	0,016 (2)
ZrO <sub>2</sub>	0,006 (1)

*n.d.: no determinado*  
*En paréntesis el error experimental*



**Figura 4.1.** *Difractograma de rayos X de la sílice.*

## IV.2. Carbonato de calcio

El carbonato de calcio ( $\text{CaCO}_3$ ) se ha usado en la obtención del vidrio como fuente de calcio. Según Fernández Navarro [5] esta materia prima debe presentar un porcentaje de  $\text{CaCO}_3$  no menor al 96 %, el carbonato de calcio empleado en el presente trabajo posee una pureza  $> 99,0$  %, con una pérdida por calcinación (43,75 % en peso) cercana a la teórica (43,97 % en peso) tabla IV.2.

**Tabla IV.2.**  
*Análisis químico del  $\text{CaCO}_3$ , obtenido mediante FRX*

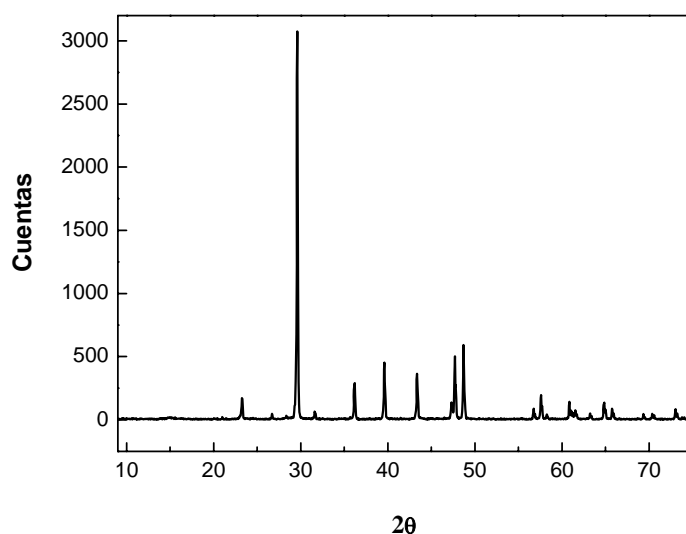
Especie química	% en peso
$\text{Al}_2\text{O}_3$	0,009 (3)
$\text{CaO}$	55,5 (2)
$\text{Fe}_2\text{O}_3$	0,0010 (3)
$\text{K}_2\text{O}$	0,012 (3)
$\text{MgO}$	0,08 (1)
$\text{Na}_2\text{O}$	0,018 (2)
$\text{SiO}_2$	n.d.
$\text{SO}_4$	0,008 (2)
$\text{TiO}_2$	n.d.

*n.d.: no determinado*

*En paréntesis el error experimental*

La superficie específica ha sido determinada mediante la técnica BET, obteniendo un valor de  $0,20 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ , y mediante dispersión de luz láser se ha determinado que el polvo de  $\text{CaCO}_3$  presenta una distribución de tamaño bimodal, con dos máximos en  $15 \mu\text{m}$  y  $0,35 \mu\text{m}$ , con un tamaño medio de grano ( $D_{50}$ ) de  $13,80 \mu\text{m}$ .

En la figura 4.2 se observa que el  $\text{CaCO}_3$  está formado únicamente por la fase calcita.



**Figura 4.2.** Difractograma de rayos X del  $\text{CaCO}_3$ . Todos los picos de difracción observados corresponden a la fase mineral calcita. Ficha ICSD usada para la identificación: 72-1937.

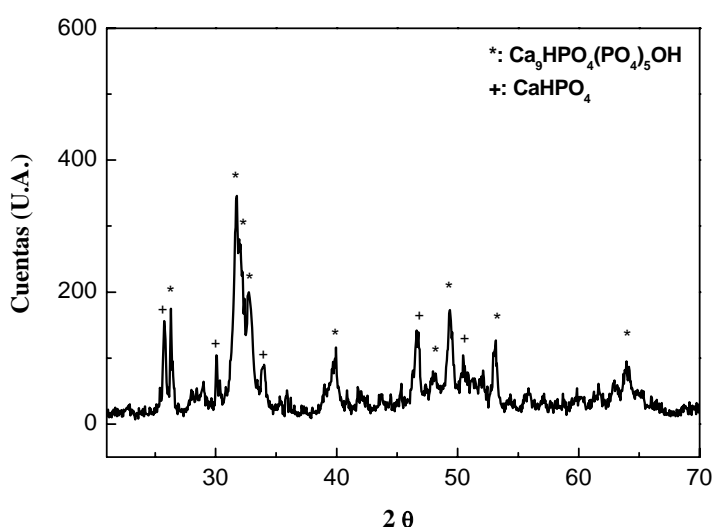
### IV.3.Fosfato tricálcico

El fosfato tricálcico se ha usado como fuente de  $\text{P}_2\text{O}_5$ . Para los cálculos de la mezcla para la obtención del vidrio se ha tenido en cuenta que también esta materia prima aporta  $\text{CaO}$ .

#### IV.3.1.Precursor de fosfato tricálcico

Se ha usado un precursor de fosfato de calcio, obtenido por precipitación, el cual ha sido suministrado por el Prof. Anseau del Departamento General de Química Orgánica y Biomédica de la Universidad de Mons-Hainaut de Bélgica.

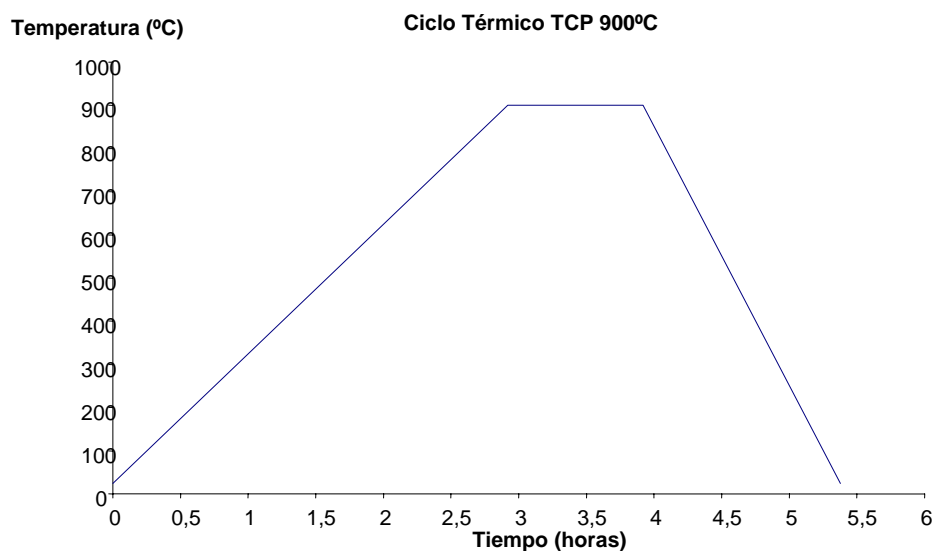
Mediante DRX se ha determinado que las fases presentes en el precursor son principalmente  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$  y  $\text{CaHPO}_4$ , hidróxido fosfato de calcio hidrogenado y monetita, respectivamente. Por lo tanto, se ha sometido a tratamientos térmicos con el fin de transformar el precursor a fosfato tricálcico.



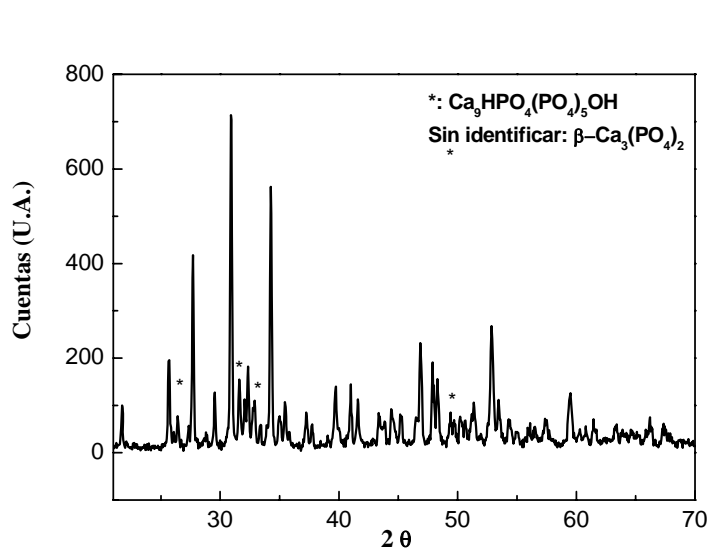
**Figura 4.3.** Difractograma de rayos X del precursor de fosfato tricálcico. Fichas ICSD usadas para la identificación:  $\text{CaHPO}_4$ : 71-1760,  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ : 46-0905.

#### IV.3.2.Tratamiento térmico

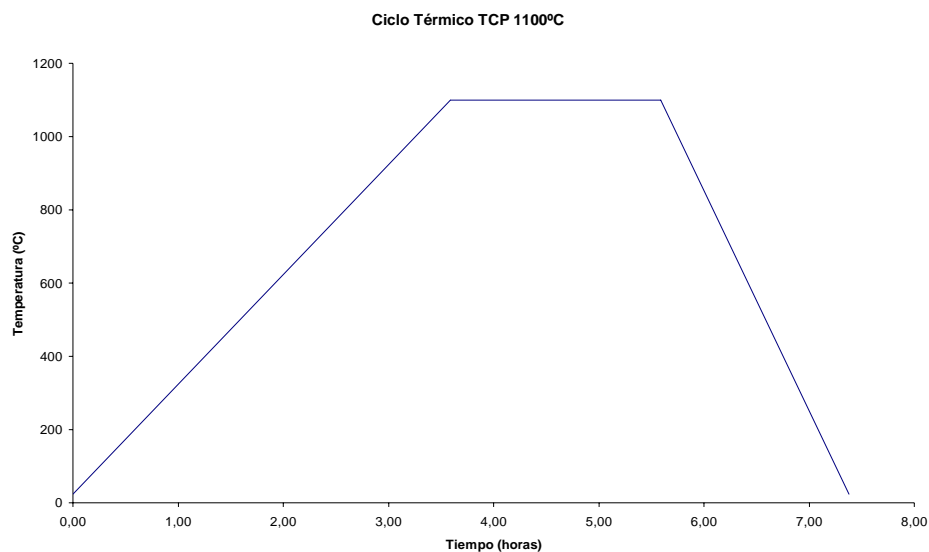
Con el fin de obtener fosfato tricálcico puro el precursor ha sido sometido a diferentes tratamientos térmicos. Se realizó un primer tratamiento térmico, figura 4.4, a 900 °C durante 1 hora, el estudio por DRX (figura 4.5) indica que la muestra presenta principalmente  $\beta$ -fosfato tricálcico ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2=\text{TCP}$ ) y una fase minoritaria de  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ , para lograr la total transformación de esta última fase se aumentó la temperatura y el tiempo de tratamiento térmico, figura 4.6. Los resultados de DRX, figura 4.7, indican que la muestra tratada a 1100 °C durante 2 horas solo presenta picos de difracción correspondientes a  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .



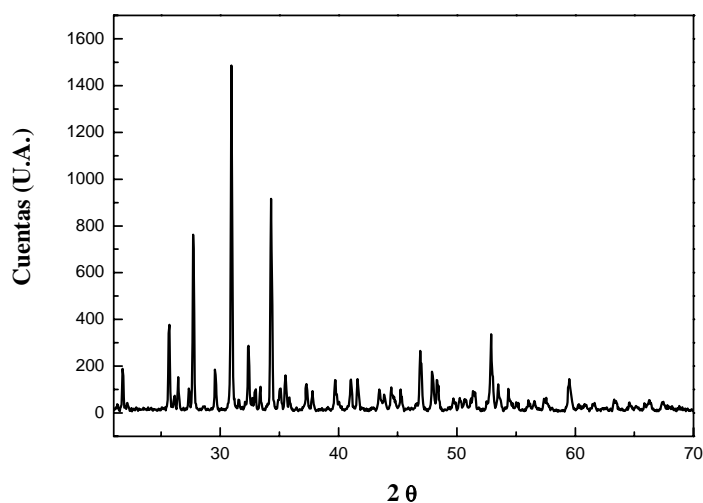
**Figura 4.4.** Ciclo térmico realizado al precursor de TCP, calentamiento a  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $900^{\circ}\text{C}$ , mantenimiento a esta temperatura durante 1 hora y enfriamiento a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta temperatura ambiente.



**Figura 4.5.** Difractograma de rayos X para el precursor de fosfato tricálcico tratado a  $900^{\circ}\text{C h}^{-1}$  durante 1 hora. Fichas ICSD usadas para la identificación:  $\text{Ca}_9\text{HPO}_4(\text{PO}_4)_5\text{OH}$ : 46-0905,  $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ : 70-2065.



**Figura 4.6.** Ciclo térmico realizado al precursor de TCP, calentamiento a  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta  $1100^{\circ}\text{C}$ , mantenimiento a esta temperatura durante 2 horas y enfriamiento a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  hasta temperatura ambiente.



**Figura 4.7.** Difractograma de rayos X para el precursor de fosfato tricálcico tratado a  $1100^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas. Todos los picos de difracción observados corresponden a la fase  $\beta$ -TCP. Ficha ICSD usada para la identificación: 70-2065.

La caracterización química, realizada por FRX, del precursor de TCP con tratamiento térmico de  $1100^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas (desde ahora TCP) se muestra en la tabla IV.3. Se observa que el TCP presenta una relación % en peso  $\text{CaO}:\text{P}_2\text{O}_5$  igual a la teórica, siendo el MgO la mayor impureza.



**Tabla IV.3.**

*Resultados de FRX para el precursor de TCP con tratamiento térmico de 1100°C durante 2 horas.*

Especie química	% en peso
<b>Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	nd
<b>CaO</b>	54,2 (2)
<b>Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub></b>	0,040 (3)
<b>K<sub>2</sub>O</b>	0,008 (1)
<b>MgO</b>	0,32 (2)
<b>MnO</b>	0,013 (2)
<b>P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	45,7 (2)
<b>SiO<sub>2</sub></b>	nd
<b>SrO</b>	0,004 (1)
<b>TiO<sub>2</sub></b>	0,012 (2)
<b>Na<sub>2</sub>O</b>	0,008 (2)
<b>Relación (%peso) CaO/ P<sub>2</sub>O<sub>5</sub></b>	1,185
<b>Relación molar Ca/P</b>	1,50

*n.d.: no determinado*

*En paréntesis el error experimental*

## REFERENCIAS

- [1] M. Ogino, F. Ohuchi, and L. L. Hench, "Compositional Dependence of the Formation of Calcium-Phosphate Films on Bioglass," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 14, no. 1, pp. 55-64, 1980.
- [2] W. Vogel, "Chemistry of glass. Westerville, OH," The American Ceramic Society, 1985, p. 325.
- [3] L. Devesa, A. Pazo, C. Santos, A. Martinez, F. Guitian, and J. S. Moya, "SiO<sub>2</sub>-based glass/bone interfacial reactions," *Acta Materialia*, vol. 46, no. 7, pp. 2559-2563, 1998.
- [4] M. Vallet-Regi, C. V. Ragel, and A. J. Salinas, "Glasses with medical applications," *European Journal of Inorganic Chemistry*, no. 6, pp. 1029-1042, 2003.
- [5] J. F. Navarro, "El vidrio," Spain: 2003, p. 270.
- [6] K. Ohura, T. Nakamura, T. Yamamuro, Y. Ebisawa, T. Kokubo, Y. Kotoura, and M. Oka, "Bioactivity of CaO-SiO<sub>2</sub> Glasses Added with Various Ions," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 95-100, 1992.

## **CAPÍTULO V**

### **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL VIDRIO DE COMPOSICIÓN EUTÉCTICA DEL SISTEMA WOLLASTONITA - FOSFATO TRICÁLCICO**



## V.OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL VIDRIO DE COMPOSICIÓN EUTÉCTICA DEL SISTEMA WOLLASTONITA - FOSFATO TRICÁLCICO

En este capítulo se describe el proceso de obtención del vidrio de composición eutéctica del sistema wollastonita (W) – fosfato tricálcico (TCP). Además se muestra la caracterización físico-química, y se presentan los datos de bioactividad y biocompatibilidad *in vitro* del vidrio obtenido.

### V.1.Introducción

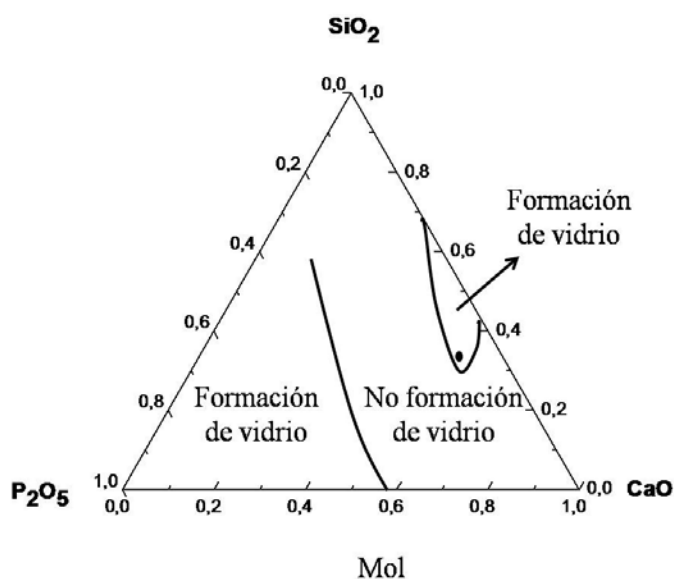
El sistema binario W-TCP es de tipo eutéctico [1]. El punto eutéctico pseudowollastonita (ps-W) –  $\alpha$  fosfato tricálcico ( $\alpha$ -TCP) está situado al 60% en peso de W y 40% de TCP y su temperatura es  $1402 \pm 3^\circ\text{C}$ .

En la tabla V.1 se muestra la composición en óxidos molar y en peso del punto eutéctico del sistema W-TCP.

**Tabla V.1.**  
*Composición en óxidos molar y en peso, del punto eutéctico del sistema W-TCP.*

Óxidos	Moles	% Moles	% Peso
SiO <sub>2</sub>	0,52	33,4	31,0
CaO	0,90	58,3	50,7
P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	0,13	8,3	18,3

Ohtsuki y col. [2] establecieron las regiones de formación de vidrio dentro del sistema SiO<sub>2</sub>-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. En la figura 5.1 se muestran estas zonas y además se ha situado la composición eutéctica del sistema W-TCP. Donde se puede observar qué punto eutéctico se encuentra dentro de la zona de formación de vidrio en la región de máximo contenido de calcio, lo que indica no sólo que es posible obtener un vidrio con esta composición sino que la temperatura de fusión será mínima.



**Figura 5.1.** Zonas de formación de vidrio para el sistema  $\text{SiO}_2$ - $\text{CaO}$ - $\text{P}_2\text{O}_5$  establecidas por Ohtsuki y col.[2]. (●) Composición eutéctica del sistema W-TCP.

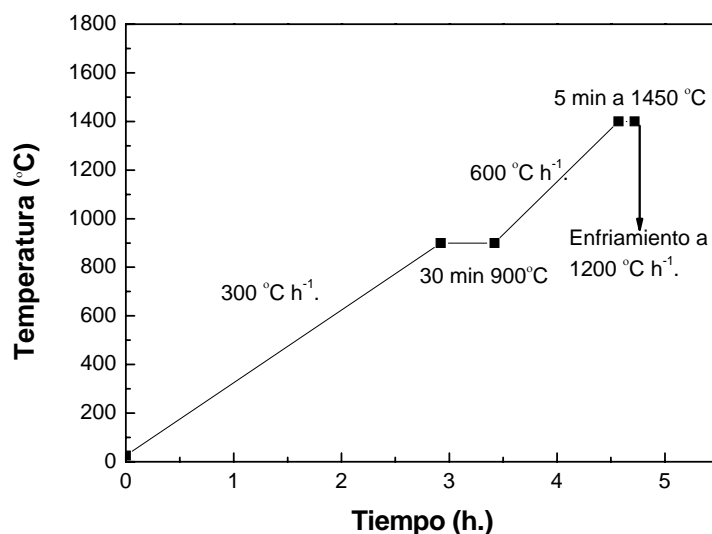
Este vidrio se ha formulado con un 58,3 % en moles de  $\text{CaO}$  (catión modificador de la red vítrea) y un 41,7 % en moles de  $\text{P}_2\text{O}_5 + \text{SiO}_2$  (formadores de vidrio), así pues, se trata de un vidrio invertido, formulado con una cantidad mayor de modificadores de red que de formadores [3].

## V.2.Obtención del vidrio eutéctico

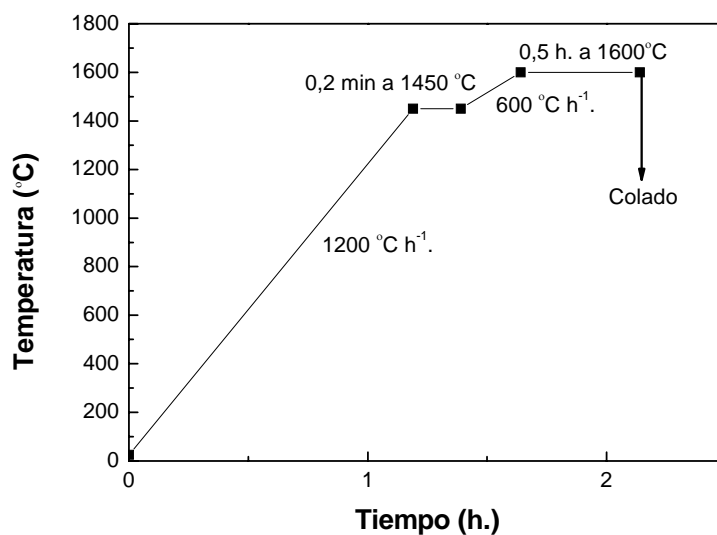
La composición eutéctica del sistema W-TCP [1] (60,0 % en peso de W- 40,0 % en peso de TCP) se ha preparado mediante la mezcla de  $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{SiO}_2$  y TCP en polvo, todas estas materias primas han sido caracterizadas en el capítulo IV. Las materias primas (613 gr) se han mezclado rigurosamente en una túrbula durante 2 horas. La mezcla obtenida se ha calcinado en un crisol de Pt-Rh (90,0-10,0 % en peso) siguiendo el ciclo térmico de la figura 5. 2. Este ciclo térmico, de descarbonatación a 900 °C y de fusión a 1450 °C, se repitió tres veces, al final de cada ciclo se llenaba de nuevo el crisol con la mezcla, para tener al final cantidad suficiente para obtener una pieza de vidrio de 8 gr cada vez que se repetía este procedimiento.

Para obtener un fundido con una viscosidad suficientemente baja como para poder ser colado, fue necesario alcanzar la temperatura de 1600 °C. Se procedió siguiendo el ciclo

térmico de la figura 5.3, seguidamente el fundido fue colado sobre una placa de latón precalentada a 300 °C.



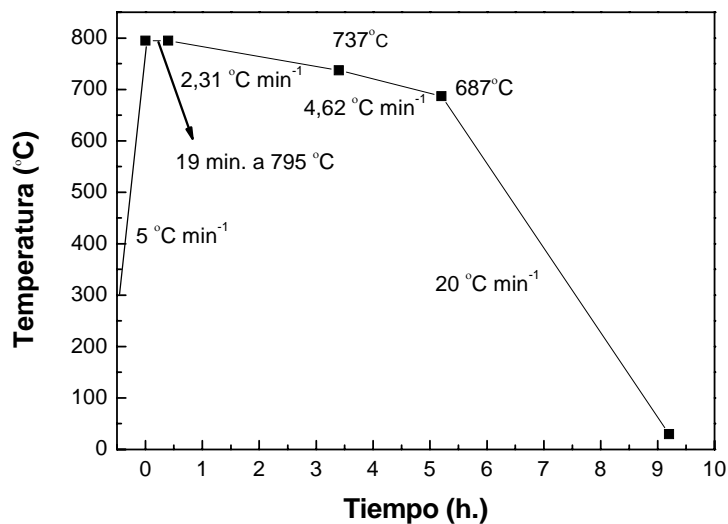
**Figura 5.2.** Ciclo térmico de calentamiento con el fin de descarboxenar la muestra y compactar.



**Figura 5.3.** Ciclo térmico de fusión y colado de la composición eutéctica.

Una vez caracterizada la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ), como se mostrará más adelante, para un primer lote de vidrio sin recocer y mediante el método de Corning [4], se estableció el tratamiento térmico de recocido. Por lo tanto, una vez colado el vidrio se

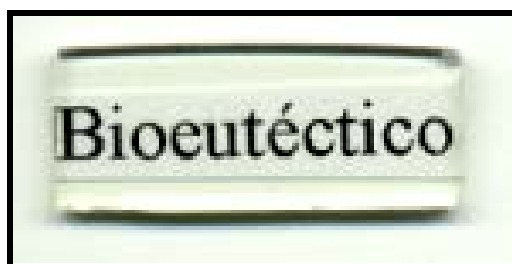
introduce en una mufla a temperatura de 300 °C y se realiza el tratamiento de recocido a  $T = \text{temperatura de transición vítrea } (T_g) + 5 \text{ °C}$  durante 19 min, con el fin de eliminar las tensiones internas, y se enfría lentamente siguiendo el ciclo térmico de la figura 5.4.



**Figura 5.4.** Ciclo térmico de recocido establecido mediante el método de Corning [4].

### V.3.Caracterización del vidrio eutéctico

Como se puede observar en la figura 5.5, el vidrio recocido es transparente, libre de grietas y sin burbujas.



**Figura 5.5.** Foto del vidrio obtenido por colado a temperatura ambiente.

El vidrio obtenido según el proceso descrito en el apartado anterior fue caracterizado desde el punto de vista químico (análisis químico por Fluorescencia de Rayos X) y estructural (RMN-MAS del  $^{29}\text{Si}$  y  $^{31}\text{P}$ , DRX y MET).



### V.3.1. Caracterización química

Previamente a su estudio por fluorescencia de rayos X (FRX), el vidrio fue molido hasta un tamaño de partícula  $< 63 \mu\text{m}$  en un molino de WC. Mediante esta técnica se ha comprobado que el vidrio obtenido mantiene la composición de partida, como se muestra en la tabla V.2, y tiene un contenido de impurezas no significativo. La mayor impureza (0,10 % en peso de MgO) procede del  $\text{CaCO}_3$  y del TCP utilizados en la preparación del vidrio (véase capítulo IV).

**Tabla V.2.**

*Resultados de los análisis mediante fluorescencia de rayos X del vidrio eutéctico. Valores mostrados en % en peso.*

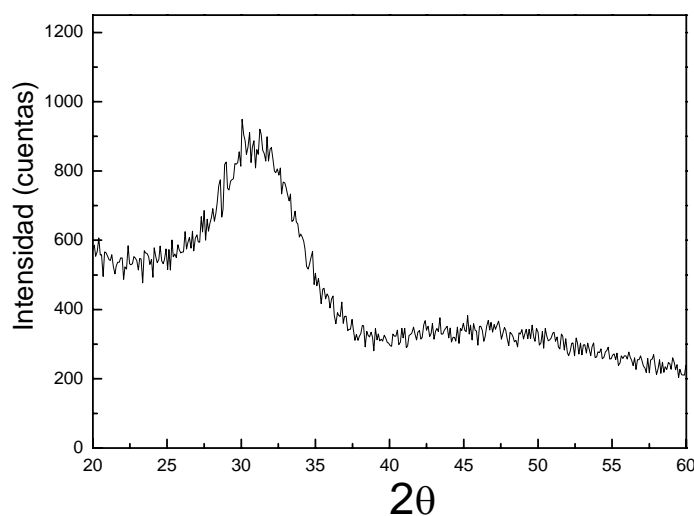
W-TCP	CaO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	TiO <sub>2</sub>
Experimental	50,6(2)	31,0(2)	18,3(2)	0,10(1)	0,052(3)	0,007(1)	0,040(5)	0,005(1)	0,017(2)
Teórico	50,7	31,0	18,3	--	--	--	--	--	--

La densidad del vidrio, obtenida por Arquímedes, fue  $2,91 \pm 0,2 \text{ gr cm}^{-3}$ .

### V.3.2. Caracterización estructural

#### *Difracción de rayos X*

El vidrio molido ( $< 63 \mu\text{m}$ ) se ha caracterizado mediante difracción de rayos X (DRX), los resultados indican que el difractograma de DRX obtenido (figura 5.6) es característico de un material amorfo, debido a que sólo presenta un pico ancho (centrado en  $2\theta$ -30°) característico de los vidrios de sílico-fosfatos-alcalinotérreos. Esta señal de difracción corresponde a las interacciones moleculares entre próximos vecinos y confirman la estructura amorfa y desordenada del vidrio [5-7].



**Figura 5.6.** Difractograma de rayos X del vidrio molido.

### *Espectroscopía de resonancia magnética nuclear*

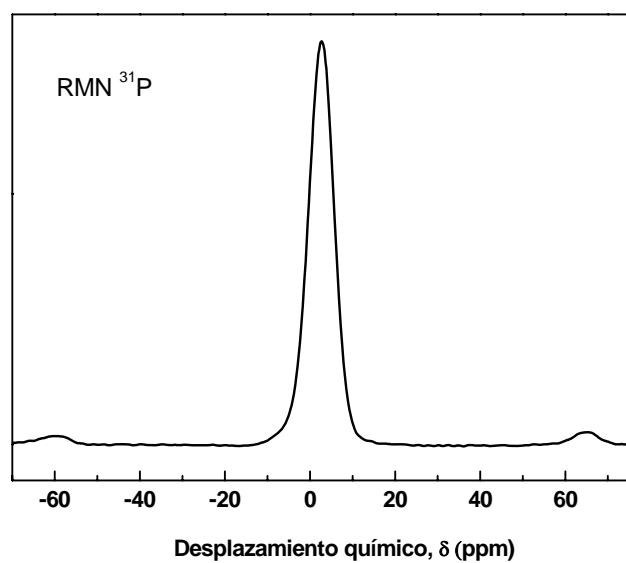
La resonancia magnética nuclear (RMN) es una técnica esencial para el estudio de los vidrios de silicato, ya que permite caracterizar su estructura; la cual presenta un rol importante en los mecanismos de bioactividad.

#### RMN-MAS de $^{31}\text{P}$

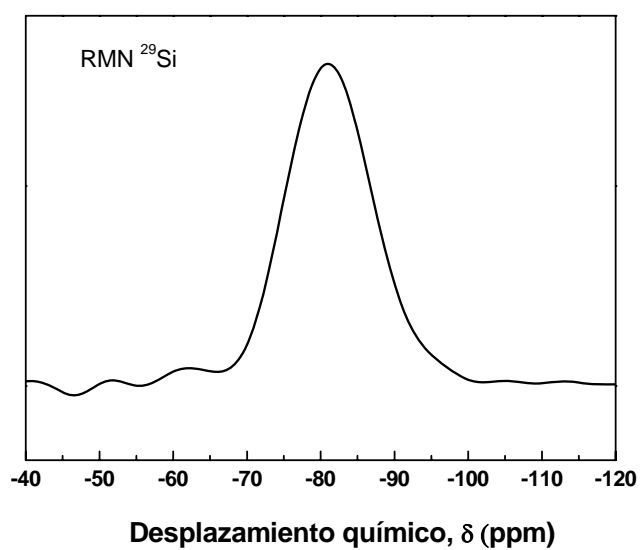
El espectro de RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  del vidrio en polvo se muestra en la figura 5.7, donde se observa solo un pico centrado a  $2,73 \pm 0,5$  ppm. Esto indica que todos los P son del tipo  $\text{Q}^0$ , unidades aisladas de tetraedros  $[\text{PO}_4^{3-}]$ , donde uno de los oxígenos presenta un doble enlace con el fósforo [8;9]. No se ha encontrado evidencia de la presencia de enlaces del tipo P-O-P y P-O-Si.

#### RMN-MAS de $^{29}\text{Si}$ :

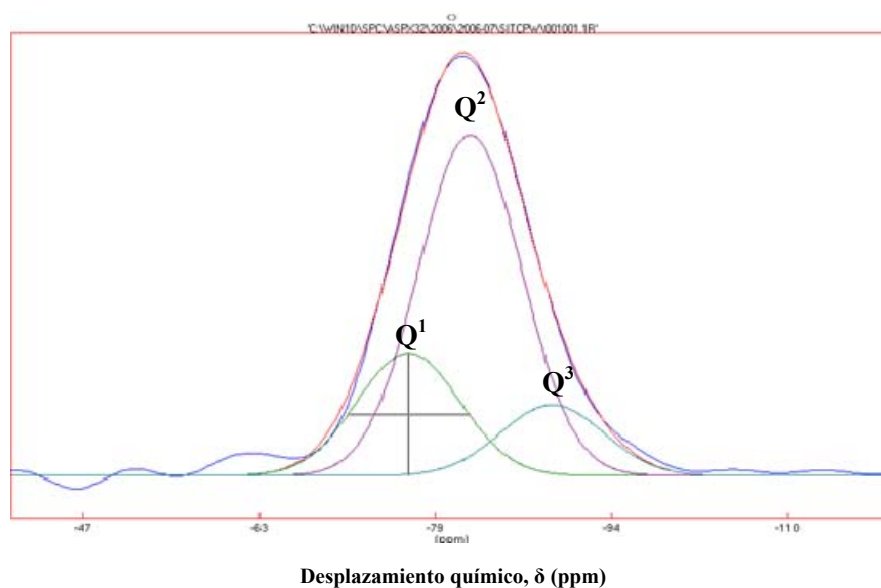
El espectro RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  del vidrio en polvo presenta un pico ancho con un desplazamiento químico centrado en  $-80,8 \pm 0,5$  ppm (figura 5. 8). El espectro fue deconvolucionado en tres componentes -76,2; -81,7 y -89,0 ppm, las cuales pueden ser asignadas a unidades del tipo  $\text{Q}^1$ ,  $\text{Q}^2$  y  $\text{Q}^3$ , respectivamente [8;9] (figura 5. 9). Los porcentajes de área para cada especie son: 23%  $\text{Q}^1$ , 64%  $\text{Q}^2$  y 13%  $\text{Q}^3$ .



**Figura 5.7.** Espectro RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  del vidrio.



**Figura 5.8.** Espectro RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  del vidrio.

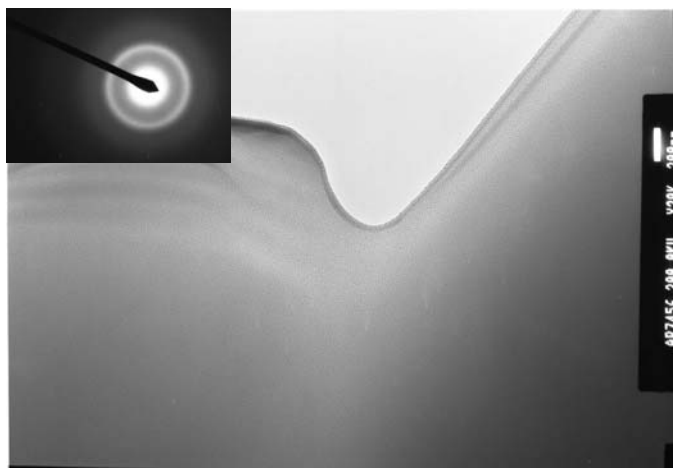


**Figura 5. 9.** Deconvolución del espectro RMN-MAS de  $^{29}\text{Si}$  del vidrio.

Los resultados de RMN-MAS indican que el vidrio presenta estructuralmente una matriz rica en silicatos con especies  $\text{Q}^1$ ,  $\text{Q}^2$  y  $\text{Q}^3$ , en la que están dispersas regiones ricas en calcio y fósforo. La señal mayoritaria corresponde al tipo  $\text{Q}^2$ , que indica la presencia de tetraedros de silicato formando cadenas o anillos.

#### *Microscopía Electrónica de Transmisión*

Se estudiaron muestras del vidrio recocido, mediante MET-DAS, con el fin de determinar si durante el proceso de obtención del vidrio o durante el recocido se produjo separación de fases, o formación de núcleos de alguna fase cristalina. Los resultados obtenidos (figura 5.10) indican que al nivel de resolución de esta técnica, el vidrio obtenido no presenta separación de fases o núcleos de cristalización, ya que los resultados de DAS (parte superior izquierda de la imagen mostrada en la figura 5.10) no muestran fases que difracten.



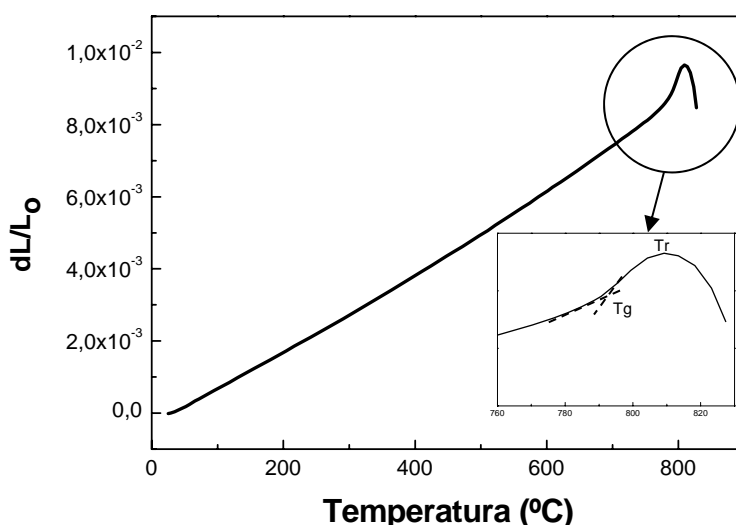
**Figura 5. 10.** Micrografía y análisis DAS del vidrio, obtenidas por MET.

### V.3.3.Caracterización térmica

Las propiedades térmicas del vidrio se han determinado sobre muestras sólidas o en polvo con el tamaño y la forma adecuada para cada técnica.

#### *Dilatometría*

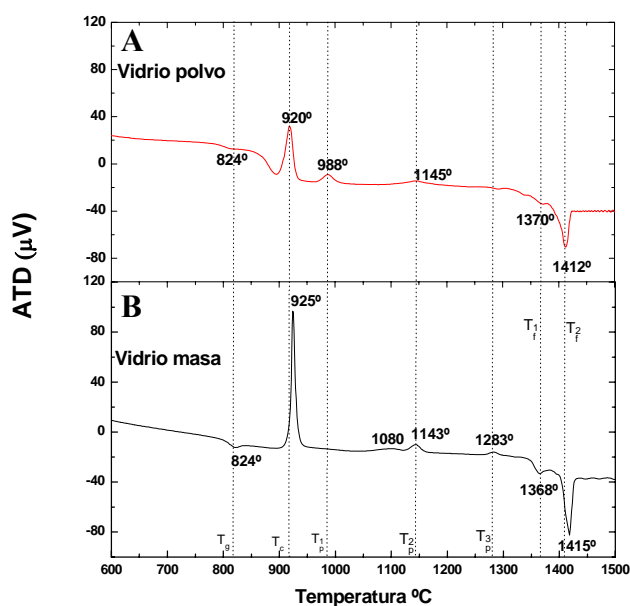
Las características dilatométricas se han determinado utilizando una probeta de vidrio sin recocer con dimensiones iguales a  $10 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ , y con una velocidad de calentamiento de  $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ . La figura 5.11 muestra la curva de expansión térmica lineal del vidrio, donde se puede observar que la temperatura de transición del vidrio ( $T_g$ ) y la temperatura de reblandecimiento ( $T_r$ ) son  $790 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  y  $810 \pm 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente. El coeficiente de expansión térmica ( $\alpha$ ) entre 50 y 600  $^\circ\text{C}$ , calculado a partir de la pendiente de la zona lineal de la curva dilatométrica (figura 5.11) y la ecuación III.6 (véase capítulo III) , es igual a  $10,8 \pm 0,1 \times 10^{-6} \text{ K}^{-1}$ .



**Figura 5.11.** Curva dilatométrica del vidrio obtenida a  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , para determinar el  $T_g$  y  $T_r$  del vidrio.

#### *Análisis Térmico Diferencial*

Cuando se estudiaron muestras, molidas ( $< 63 \mu\text{m}$ ) y sólidas, del vidrio mediante análisis térmico diferencial (ATD), a velocidad de calentamiento constante ( $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ), se observaron diferentes fenómenos. En la figura 5.12A se muestra la curva de ATD obtenida para la muestra en polvo, donde se observa un pico endotérmico que se inicia a  $\sim 800^{\circ}\text{C}$ , el cual se ha asignado al  $T_g$ . Los picos exotérmicos con máximos a  $\sim 920$ ,  $\sim 988$  y  $\sim 1145^{\circ}\text{C}$  corresponden a la cristalización de apatita, a la cristalización de la wollastonita-2M y las transformación polimórfica de wollastonita-2M a pseudowollastonita, respectivamente (en el capítulo VI se abordará la identificación y asignación de estos efectos exotérmicos mediante tratamientos térmicos, seguidos de caracterización por DRX y difracción de neutrones). Igualmente, se observan dos picos endotérmicos con máximos a  $\sim 1370^{\circ}\text{C}$  y  $\sim 1412^{\circ}\text{C}$ . El segundo corresponde a la temperatura de fusión del eutéctico del sistema y el primero se atribuye a la fusión del vidrio residual presentes en los bordes de grano del material cristalizado, por lo que se puede afirmar que a altas temperaturas permanece una fase vítrea o amorfa residual, en la que se encuentran todas las impurezas del vidrio (tabla V.2).



**Figura 5. 12.** ATD de la muestra de vidrio (A) en polvo y (B) en masa. Obtenida a  $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

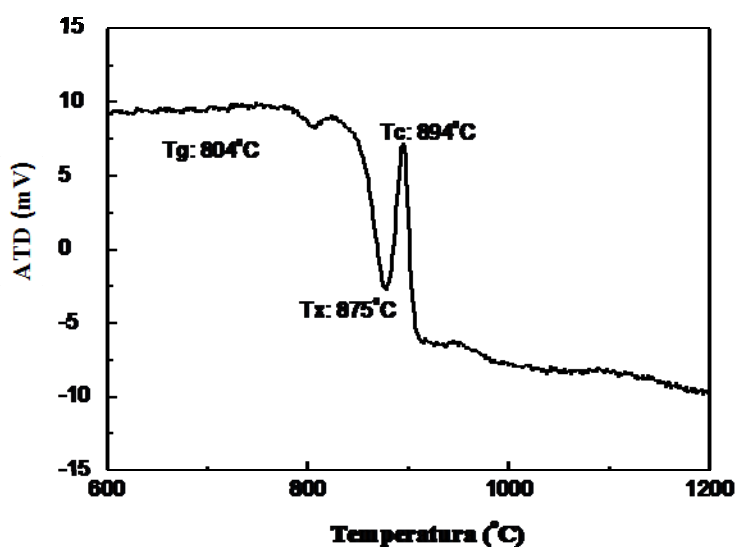
La curva de ATD para la muestra sólida figura 5.12B muestra un comportamiento cercano al presentado por la muestra en polvo, las diferencias encontradas son las siguientes:

- El inicio y máximo del pico de cristalización de apatita, denominados  $T_x$  y  $T_c$  respectivamente, ocurren antes en la muestra en polvo.
- El pico de cristalización de apatita ( $\sim 925^{\circ}\text{C}$ ) presenta un efecto exotérmico máximo y más estrecho en la muestra en masa.
- En la muestra en masa existe un pico exotérmico adicional, a  $\sim 1283^{\circ}\text{C}$ , de transformación de fase que no se observa para la muestra en polvo, figura 5.12.

Ambas muestras, en polvo y en masa, presentan dos picos de fusión a  $\sim 1370$  y  $\sim 1412^{\circ}\text{C}$ .

Las diferencias observadas para las temperaturas ( $T_x$  y  $T_c$ ) entre la muestra en masa y en polvo, se debe en parte a que las muestras en polvo presentan un área y energía superficial más alta que el vidrio en masa, esto da como resultado una baja temperatura de cristalización.

Con el objetivo de determinar el efecto de la velocidad de calentamiento, se ha realizado un ATD para la muestra en polvo a  $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , el resultado se muestra en la figura 5.13.



**Figura 5. 13.** ATD de la muestra de vidrio en polvo. Obtenida a  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

Al comparar los resultados obtenidos para los estudios por ATD a  $5$  y  $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$  se puede indicar que:

- Los fenómenos observados,  $T_g$  y  $T_c$ , ocurren a temperaturas más bajas ( $\sim 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) si el ensayo se realiza a  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .
- Existen fenómenos exotérmicos y endotérmicos que son identificados más fácilmente en la muestra ensayada a  $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

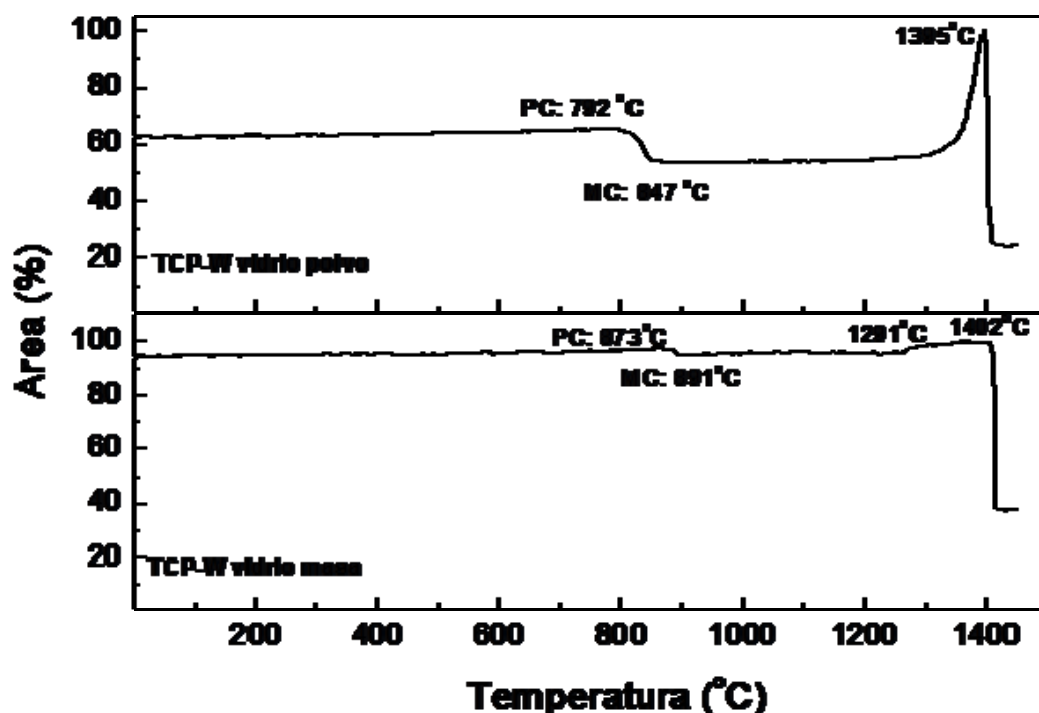
### *Microscopía de Calefacción*

Otras propiedades térmicas, tales como el rango de sinterización de las muestras en polvo y contracción del vidrio en masa, así como la temperatura de fusión han sido estudiadas mediante microscopía de calefacción. Este ensayo se ha realizado a una velocidad de calentamiento igual a  $5\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ .

En la figura 5.14 y en la tabla V.3 se muestran los resultados obtenidos mediante microscopía de calefacción. Se puede observar que la muestra de polvo compactado presenta una contracción máxima a  $847\text{ }^{\circ}\text{C}$ , debida a los procesos de sinterización en condiciones de flujo viscoso que sufre la misma. Mientras que para la muestra en masa se observa una mínima contracción entre  $873\text{--}891\text{ }^{\circ}\text{C}$  la cual puede estar asociada al proceso de cristalización del vidrio. A  $1291\text{ }^{\circ}\text{C}$  se observa una expansión en el vidrio en masa que



se debe atribuir a la transformación de apatita a  $\alpha$ -TCP (véase capítulo VI). Tanto el vidrio en masa como en polvo funden a  $\sim 1402^\circ\text{C}$ .












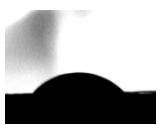


**Figura 5. 14.** Medida de la contracción/dilatación de una probeta de vidrio en (A) polvo y (B) en masa, obtenida mediante microscopía de calefacción realizada hasta  $1450^\circ\text{C}$ , con velocidad de calentamiento de  $5^\circ\text{C min}^{-1}$ .

Al comparar el resultado de microscopía de calefacción de la muestra en polvo (figura 5.14) con el ATD de la figura 5.13 se observa que el inicio de la cristalización ( $T_x$ :  $875^\circ\text{C}$ ) ocurre después del final del estado de sinterización o máxima contracción ( $M_C$ :  $847^\circ\text{C}$ ). Teniendo en cuenta ambos estudios se deduce que el vidrio a temperaturas superiores a  $875^\circ\text{C}$  pierde su estructura amorfa, ya que tienen lugar procesos de cristalización sucesivos. A temperaturas superiores a  $1402 \pm 3^\circ\text{C}$  el material vuelve a fundir.

**Tabla V. 3.**

*Serie de imágenes que muestran las formas correspondientes a los puntos característicos para el vidrio en polvo y en masa en función de la temperatura.*

Original	Temperatura				
	Primera contracción	Máxima contracción	Punto de reblandecimiento	Punto media bola	Fluidez
<b>Polvo</b> 	792 °C 	847 °C 	1378 °C 	1395 °C 	1405 °C 
<b>Masa</b> 	873 °C 	891 °C 	1291 °C 	1402 °C 	1414 °C 

#### V.3.4.Caracterización Mecánica

Las propiedades mecánicas del vidrio se muestran en la tabla V.4, con el fin de comparar los resultados obtenidos, también se muestran los valores del Bioglass 45S5<sup>®</sup>, Cerabone<sup>®</sup> y del hueso esponjoso y cortical [10-12]. Se puede observar que la propiedades mecánicas del vidrio son superiores a las del Bioglass 45S5<sup>®</sup> y son cercanas a las del hueso esponjoso, mientras que son inferiores a las del vitrocerámico Cerabone.

**Tabla V. 4.**

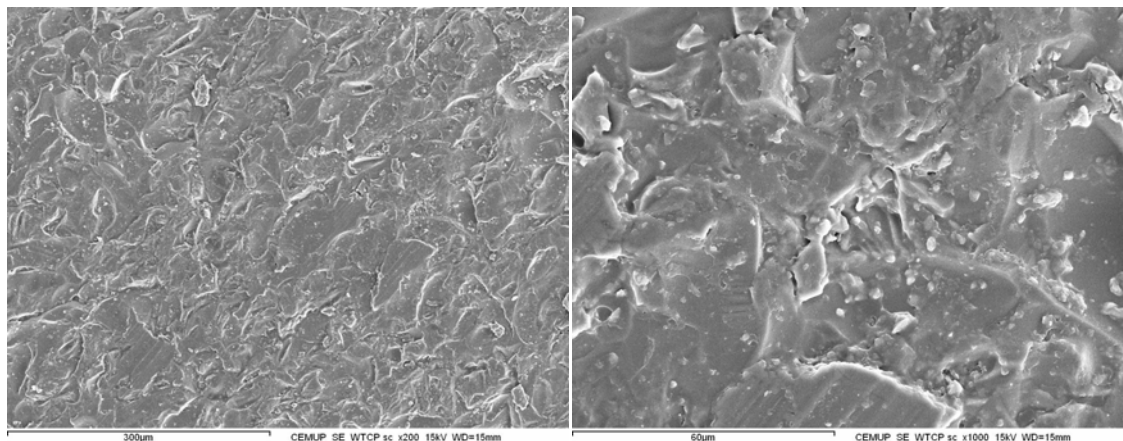
*Propiedades mecánicas del vidrio eutéctico y de otros materiales con el fin de comparar sus propiedades [10-12].*

Material	$\rho$ (g·cm <sup>-3</sup> )	E (GPa)	H <sub>v</sub> (GPa)	K <sub>IC</sub> (MPa·m <sup>1/2</sup> )	MOR (MPa)
<b>Vidrio W-TCP</b>	2,91 ± 0,02	83 ± 5	5,1 ± 0,4	0,8 ± 0,1	102 ± 9
<b>Bioglas<sup>®</sup> 45S5</b> Na <sub>2</sub> O-CaO-SiO <sub>2</sub> -P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	2,66	35	4,51	n.d.	110-140
<b>Glass-ceramics</b> <b>Cerabone A/W</b>	3,07	117	-	2,5	215
<b>Hueso</b> <b>Esponjoso /cortical</b>	1,6-2,1	4-16	-	2-12	50-150

### V.3.5. Ensayos *in vitro*

Se ha estudiado la bioactividad y la biocompatibilidad del vidrio en suero fisiológico artificial y mediante cultivos celulares, respectivamente.

La superficie del vidrio antes de los estudios *in vitro* se muestra en la figuras 5.15. Se observa que esta presenta una superficie rugosa.

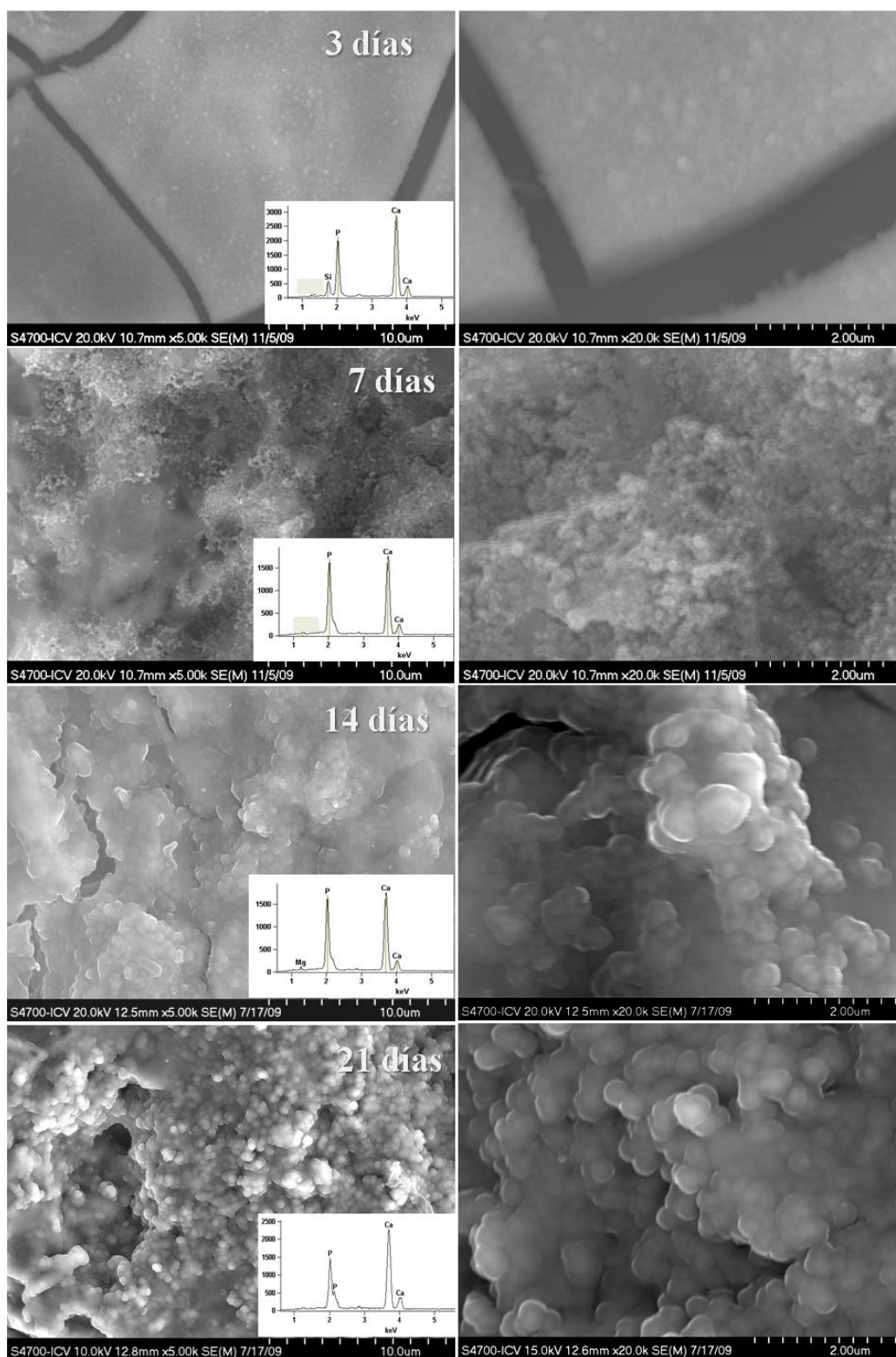


**Figura 5.15.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie de las probetas de vidrio antes de los estudios “In Vitro”.

#### *Suero Fisiológico Artificial*

El estudio de la bioactividad *in vitro* ha sido realizado sumergiendo probetas (6 X 5,7 X 8,6 mm<sup>3</sup>) de la misma serie del vidrio en Suero Fisiológico Artificial (SFA) durante 3, 7, 14 y 21 días a 36,5 °C. Después de estos períodos se estudiaron las superficies y las secciones transversales de las muestras.

En las figuras 5.16 - 5.19 se muestran los resultados obtenidos por MEB-EC-EDS. Se puede observar como después de 3 días se forma una capa de pocas micras que por microanálisis MEB-EDS, se ha determinado que está formada principalmente por Ca y P, con una relación Ca/P: 1,88, lo que sugiere que se trata de una apatita. Los agregados que forman la capa presentan una morfología globular, que después de 21 días alcanzan un tamaño de ~200 nm (figura 5.16). Las grietas observadas en la capa son producidas al secar la muestra a temperatura ambiente.

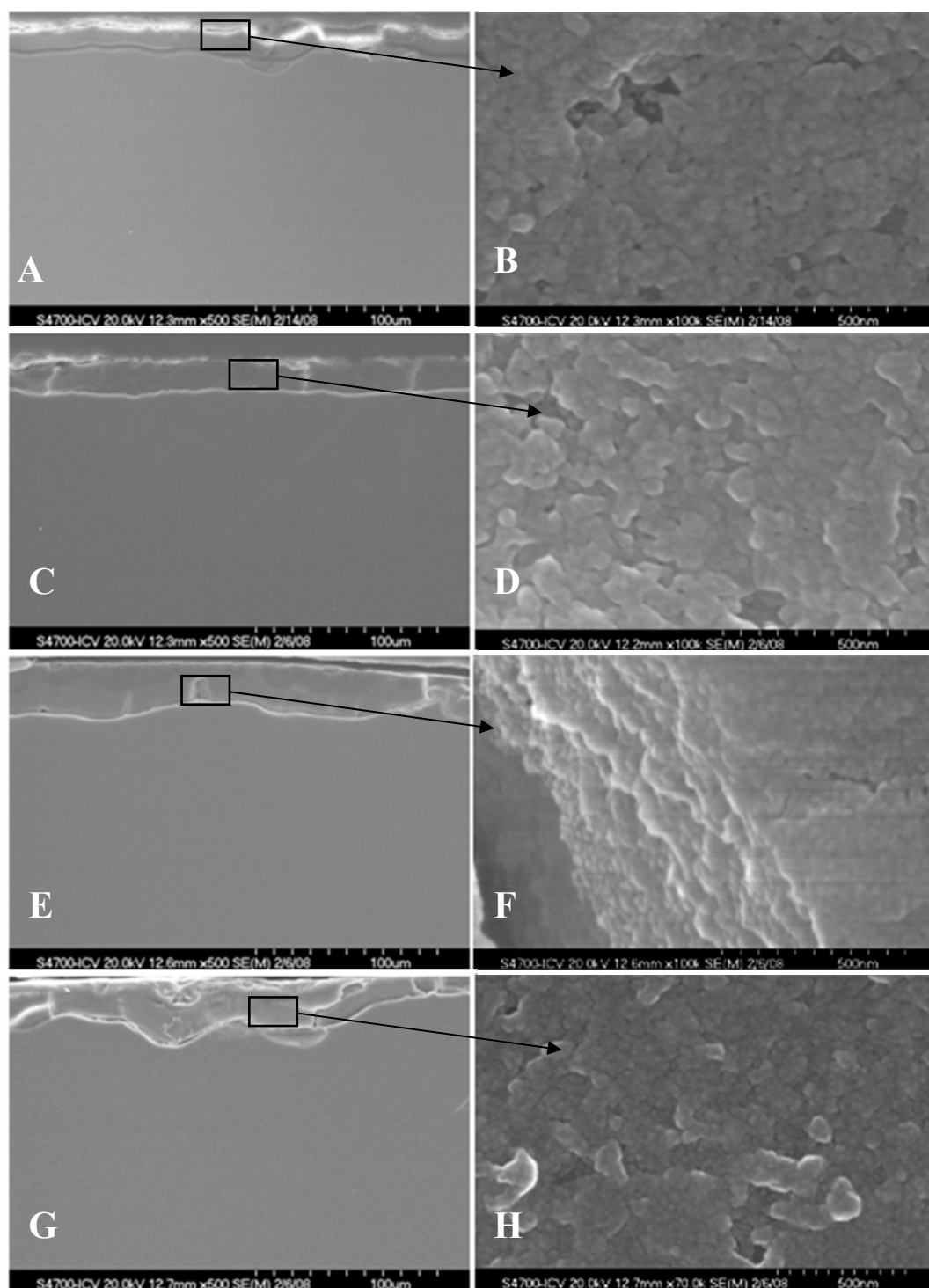


**Figura 5.16.** Micrografías y microanálisis obtenidos mediante MEB-EC-EDS de la superficie del vidrio después de expuesto al SFA durante diferentes períodos de tiempo.

Para establecer el grosor de la capa de fosfato de calcio formada, se han preparado secciones verticales de la interfaz vidrio/SFA para su estudio por MEB-EC (figuras 5.17-5.19). La capa de apatita formada se ha cuarteado como consecuencia del proceso de secado utilizado.

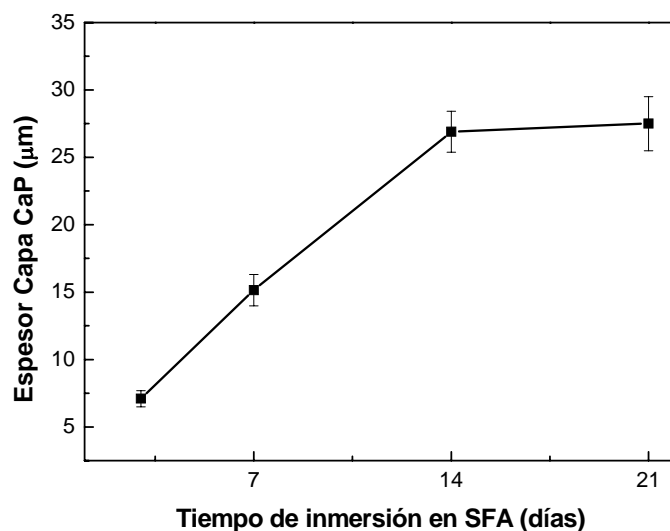
Se observa que a medida que aumenta el tiempo de exposición de las muestras en el SFA, aumenta el grosor de la capa de fosfato de calcio formada (figura 5.17). La evolución del grosor de la capa se muestra en la figura 5. 18. Para el cálculo de los errores se ha considerado el error sistemático y el aleatorio. Este último fue determinado midiendo el espesor de la capa para una misma micrografía en 5 lugares diferentes y seguidamente se ha calculado el promedio y el error de este valor, mientras que el error sistemático corresponde a la resolución del MEB.

La forma de la curva de la figura 5.18 indica que el proceso de formación de la capa de apatita tiene lugar mediante difusión de iones calcio y silicato del vidrio al SFA; y de protones y aniones fosfato desde el SFA hacia la interfaz de reacción a través de esta capa. A los 14 días de estudio se alcanza el máximo grosor de la capa. Lo que se puede explicar bien porque se llega a la saturación del sistema, porque no se disuelve más vidrio y se deja de liberar al medio iones Ca y P. Otra explicación es que la difusión de las especies iónicas a través de la capa de apatita porosa, al aumentar el grosor de esta, es cada vez más difícil.

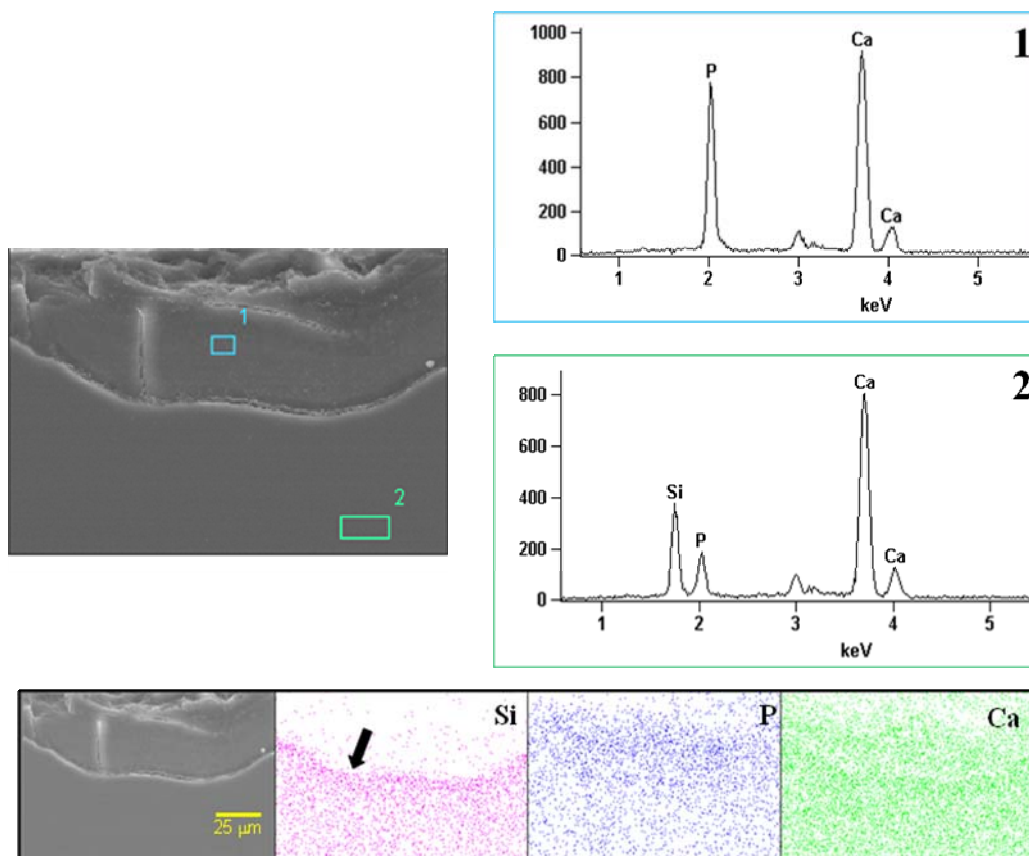


**Figuras 5.17.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC-EDS de la sección transversal del vidrio después de expuesto al SFA durante (A-B) 3 días, (C-D) 7 días, (E-F) 14 días y (G-H) 21 días.

El análisis EDS de la sección transversal de las muestras después de 21 días (figura 5.19) coincide con los resultados obtenidos durante el estudio de la superficie, ya que la capa está formada por Ca y P. Además se observa, adyacente al vidrio, una capa muy fina rica en Si.



**Figura 5.18.** Representación de la variación del espesor de la capa de apatita formada sobre el vidrio con el tiempo de exposición en SFA. Datos obtenidos de las micrografías de MEB-EC.



**Figuras 5.19.** Análisis de elementos (mapping) obtenidos mediante MEB-EC-EDS de la sección transversal del vidrio después de expuesto al SFA durante 21 días. La flecha indica la zona donde se encuentra la capa fina de Si.

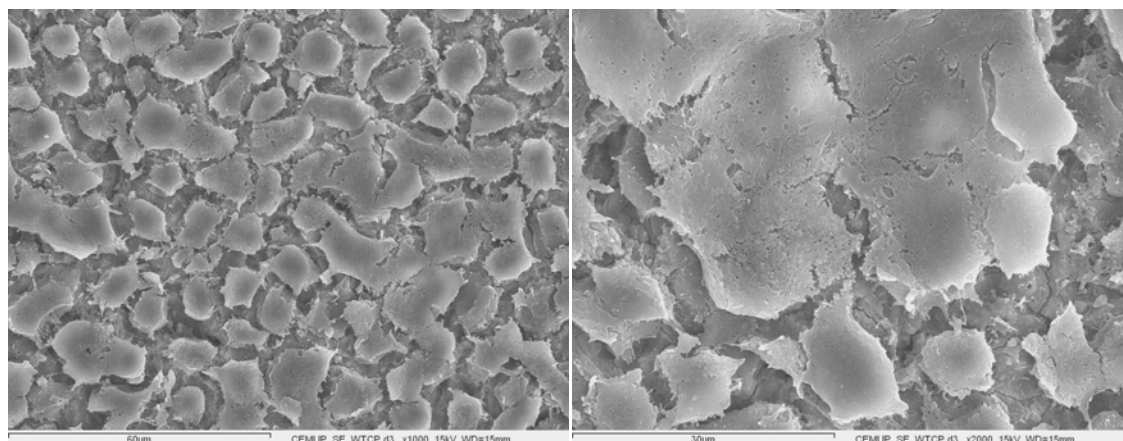
### Cultivos celulares

La biocompatibilidad del vidrio eutéctico ha sido estudiada en cultivos celulares que contienen células de osteosarcoma humano de la línea MG63. En la figura 5.15 se muestra la superficie del vidrio antes del cultivo y en la figuras 5.20- 5.21 se observa la superficie del mismo después de 3 y 7 días de siembra de células, respectivamente.

Después de 3 días las células tienen forma poligonal y están dispersas en toda la superficie del vidrio. Se pueden observar numerosos puntos de contacto con el vidrio lo que indica una buena adhesión (figura 5.20).

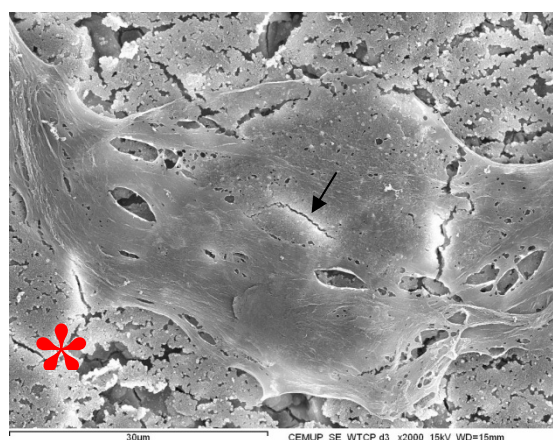
Después de 7 días las células se han extendido y su forma ha cambiado, haciéndose más alargadas, pero aún se puede ver la superficie del vidrio.





**Figura 5.20.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vidrio después de 3 días de cultivo con células MG63. Se puede observar la forma poligonal de las células.

En la figura 5.21, se muestra una zona (\*) que mediante microanálisis EDS se ha encontrado que es rica en Ca y P, esta zona es una capa que se ha formado por la interacción del vidrio con el medio de cultivo, capa similar a la formada cuando se sumerge el vidrio en SFA (figura 5.16).

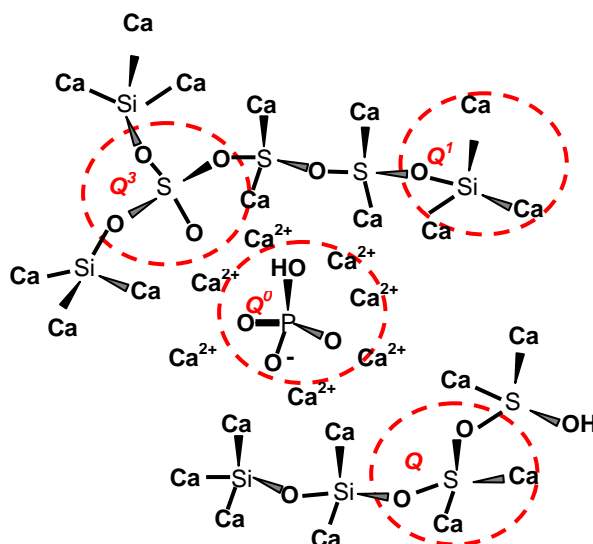


**Figura 5.21.** Micrografía obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vidrio después de 7 días de cultivo con células MG63. (\*) Capa rica en Ca y P. Zonas con rotura de las células (flecha) consecuencia del método de secado.

## V.4.Discusión

El vidrio obtenido presenta diversas características que lo convierten en un material idóneo para obtener un vitrocerámico para su uso como biomaterial, objetivo final del presente trabajo, ya que:

- Mantiene la composición eutéctica de partida (determinada por FRX), y el nivel de impurezas es despreciable.
- No existe evidencia de presencia de núcleos o fases cristalinas (determinado por DRX, MET-DAS).
- Teniendo en cuenta los resultados de MET-DAS y RMN, se puede asumir que los grupos fosfato forman islas nanométricas de ortofosfato en una matriz amorfa de silicatos alcalinotérreos. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por M. Aguiar y col. [13] para vidrios de sílico fosfatos alcalinotérreos ( $\text{SiO}_2$  -  $\text{P}_2\text{O}_5$  -  $\text{CaO}$  -  $\text{MgO}$ ). En la figura 5.22 se muestra un modelo estructural propuesto en base a los resultados de RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$  para el vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP. Las unidades aisladas de tetraedros  $[\text{PO}_4^{3-}]$  (determinadas por RMN-MAS) pueden servir como zonas nucleantes.



**Figura 5. 22.** Modelo de estructura propuesto para el vidrio eutéctico del sistema W TCP, obtenido mediante los espectros RMN-MAS de  $^{31}\text{P}$  y  $^{29}\text{Si}$ .

Por otro lado, el vidrio presenta propiedades mecánicas similares o superiores a los vidrios bioactivos comerciales. Los valores obtenidos indican que el vidrio eutéctico puede ser

usado en zonas de baja sollicitación mecánica, como en otorrinolaringología, en implantes maxilofaciales, dentales y periodontales. Estos vidrios bioactivos en masa no pueden utilizarse en implantes ortopédicos sometidos a cargas pero sus excelentes propiedades osteoconductoras hacen que puedan utilizarse en forma de polvo para relleno de defectos óseos.

#### *Estructura del vidrio vs Bioactividad*

Con el fin de comparar los resultados de los estudios *in Vitro* en SFA, obtenidos en este capítulo, con los presentes en la bibliografía se ha calculado el parámetro de Stevels o parámetro Y del vidrio, el cuál es un método teórico para evaluar la conectividad de la red de los vidrios. En este método los vidrios son considerados polímeros inorgánicos, donde el grado de polimerización está determinado por la concentración de modificadores de red dentro de la red del vidrio. El parámetro Y describe el número de oxígenos puentes por tetraedros de silicatos y puede ser calculado desde la composición molar del vidrio con la siguiente ecuación:

$$Y = 2Z - 2R \quad (V.1) [14]$$

Donde Z es el número de tipos de poliedro de oxígeno y R es la relación entre el número total de átomos de oxígenos y el número de cationes formadores de vidrio.

En la tabla V. 5 se muestra el valor del parámetro de Stevels para el vidrio obtenido en el presente trabajo (W-TCP) y para otros vidrios reportados en la bibliografía. También se muestran los resultados de RMN MAS de  $^{29}\text{Si}$  y los del estudio de la bioactividad en SFA para 3 días.

**Tabla V. 5.**

*Parámetro Stevels, característica estructural del  $^{29}\text{Si}$  por RMN-MAS y resultados de la bioactividad en SFA para diferentes vidrios reportados en la bibliografía y para el vidrio W-TCP desarrollado en el presente trabajo.*

Vidrio	Parámetro Stevels	RMN MAS de $^{29}\text{Si}$	Estudio de la bioactividad en SFA (durante 3 días)	
			Formación $\text{SiO}_2$ gel	Formación capa Ca y P
CaMg25[6;13]	0,82	$\text{Q}^1\text{-Q}^2$	No.	Si
CaMg33[6;13]	1,14	$\text{Q}^1\text{-Q}^2$	No.	Si
W-TCP	1,36	$\text{Q}^1\text{-Q}^2\text{-Q}^3$	Si. Difícil de detectar por análisis MEB-EDS. Muy fina.	Si
CaNa46 [13]	1,90	$\text{Q}^2\text{-Q}^3$	Si. Fácilmente detectable por análisis MEB-EDS.	Si
CaNa54 [13]	2,39	$\text{Q}^2\text{-Q}^3$	Si.	Si

*Composición en %moles*

**CaMg25:** 25,37  $\text{SiO}_2$ ; 10,87  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 32,62  $\text{CaO}$ ; 31,14  $\text{MgO}$

**CaMg33:** 33,60  $\text{SiO}_2$ ; 6,40  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 19,00  $\text{CaO}$ ; 41,00  $\text{MgO}$

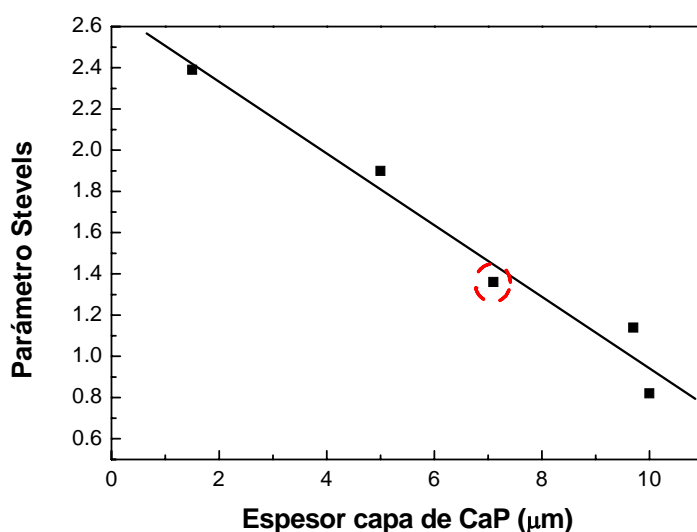
**CaNa46:** 46,00  $\text{SiO}_2$ ; 2,60  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 27,00  $\text{CaO}$ ; 24,40  $\text{Na}_2\text{O}$

**CaNa54:** 54,00  $\text{SiO}_2$ ; 1,7  $\text{P}_2\text{O}_5$ ; 22,00  $\text{CaO}$ ; 22,30  $\text{Na}_2\text{O}$

En la figura 5.23 se muestra la correlación entre el espesor de la capa fosfato de calcio después de 3 días en SFA en función del parámetro Stevels para los vidrios de la tabla V.5. Se ha obtenido un buen ajuste de los datos ya que el coeficiente de correlación ( $R=0,98$ ) se encuentra en el rango  $0,75 \leq |R| \leq 1$  [15], por lo tanto se ha validado la correlación establecida por Aguiar y col. [13] y se ha encontrado una ecuación que permite realizar una evaluación previa de la bioactividad de los vidrios de silicatos alcalinos/alcalinotérreos partiendo de su composición mediante el cálculo del parámetro Stevels:

$$\text{Parámetro Stevels} = -0,174(\pm 0,019) \times \text{Espesor capa Ca y P}(\mu\text{m}) + 2,679(\pm 0,138) \quad \text{Ec. (V.2)}$$

La ecuación V.2 es válida para parámetros de Stevels en el rango:  $0,82 \leq Y < 2,679$



**Figura 5.23.** Gráfica de correlación del espesor de la capa de Ca y P después de 3 días en SFA en función del parámetro Stevels para diferentes vidrios. (◻) Datos para el vidrio eutéctico del sistema W-TCP.

La reacción del vidrio con el SFA se ajusta al mecanismo propuesto por Hench, (capítulo I, sección 1.4.2). Según este autor el mecanismo de bioactividad en ambiente inorgánico puede resumirse en cinco etapas:

- I. Intercambio rápido de iones alcalinos y alcalinotérreos por protones del SFA.
- II. Disolución de la red del vidrio y formación de grupos silanol.
- III. Condensación y repólimerización de la capa rica en  $\text{SiO}_2$  sobre la superficie pobre en alcalinos y alcalinotérreos.
- IV. Migración de los iones Ca y P a la superficie a través de la capa rica de  $\text{SiO}_2$  formando una capa rica en fosfato de calcio. Crecimiento de esta capa amorfa mediante la incorporación de calcio y fósforo soluble de la solución de SFA.
- V. Cristalización de la capa amorfa de fosfato de calcio que mediante la incorporación de iones  $\text{OH}^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  o  $\text{F}^-$  de la solución para formar una capa de hidroxi/carbo/flúor/apatita.

Dependiendo del nivel de conectividad de la red de silicato del vidrio (parámetro Stevels y grupos  $\text{Q}^n$ ) el cambio iónico y la disolución de sílice (etapas I y II respectivamente) pueden ser procesos muy rápidos, que producen la precipitación de la capa rica de fosfato de calcio (etapa IV) antes de la condensación y repólimerización de la capa rica en  $\text{SiO}_2$  (etapa III).

Por lo tanto, los vidrios en general pueden seguir el mecanismo de bioactividad propuesto por Hench pero con características particulares debido a factores de cinética.

Por lo tanto, la formación de la capa de fosfato de calcio y la capa rica en Si son procesos competitivos, que ocurran ambas o solo la formación de la capa de fosfato de calcio depende de la estructura del vidrio. Así, se tiene que en vidrios con estructuras abiertas, donde se encuentren solo grupos  $Q^1$ - $Q^2$  de Si, el proceso de formación de la capa de fosfato de calcio predominará sobre el de formación de la zona rica en silicio. Mientras que para los vidrios donde los grupos Si sean del tipo  $Q^2$ - $Q^3$ , la formación de la zona rica en silicio, es decir la repólimerización, predominará sobre la formación de la capa de fosfato de calcio. Por otro lado, se ha observado que para el vidrio desarrollado en el presente trabajo el contenido de grupos de silicio del tipo  $Q^1$ - $Q^2$ - $Q^3$ , permite que ocurra la formación de las dos capas, siendo predominante el proceso de formación de la capa de fosfato de calcio sobre la formación de la zona rica en Si, pero sin evitar la formación de esta última.

#### *Cultivos Celulares*

Los resultados *in vitro* con cultivos celulares indican que las células presentan alta adhesión y proliferación celular, esto indica que la superficie del vidrio exhibe características tales como rugosidad y composición química superficial que producen respuestas favorables de las células. Además se ha observado la formación de una capa de Ca y P sobre el vidrio que favorece la adhesión de las células, esta capa ha sido formada por la interacción entre el vidrio y el medio de cultivo, mediante la liberación de iones Ca, P y Si desde el vidrio hacia el medio de cultivo.

Al relacionar los resultados *in vitro* obtenidos por SFA y cultivos celulares, se puede indicar que la producción de una capa rica de Ca y P no solo favorecería la unión hueso implante sino que ayuda a la proliferación y adhesión celular.

## **V.5.Conclusiones**

De todo lo expuesto a lo largo de este capítulo, se pueden extraer las siguientes conclusiones principales:

- Se ha obtenido un vidrio de composición eutéctica dentro del sistema W-TCP, el cual presenta propiedades mecánicas similares a los vidrios bioactivos usados actualmente.
- Se ha encontrado una relación entre la estructura del vidrio y su comportamiento bioactivo en SFA. Estableciéndose una correlación que permite determinar el espesor de la capa de fosfato de calcio formada en SFA después de 3 días en función del parámetro de Stevels (Y) del vidrio.
- El vidrio obtenido presenta una alta bioactividad en SFA, formando una capa de fosfato de calcio de 24  $\mu\text{m}$  después de 21 días en SFA.
- Las células MG63 han presentado una alta adhesión y proliferación celular sobre la superficie del vidrio, por lo tanto el material desarrollado en el presente capítulo es biocompatible.

## **V.5.Conclusions**

The main conclusions of this chapter can be drawn as follows:

- A glass, with the eutectic point composition of the W-TCP system, was obtained by a glass processing conventional method based on melting and casting. The mechanical properties of the bulk glass are comparable to other bioactive glasses reported in the bibliography.
- A relationship between a structure and bioactive glass properties in SBF was established. A specific correlation was found between the thicknesses of the calcium phosphate layer formed during the immersion of the glass in SBF after 3 days and the glass Stevels parameter (Y).
- The new glass had high bioactivity in SBF, and formed calcium phosphate layer, 24  $\mu\text{m}$  thick, after 21 days exposure to SBF.
- MG63 cells, from a human osteosarcoma, seeded onto the glass showed strong adhesion and quick proliferation on the glass surface.

## REFERENCIAS

- [1] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. Deaza, "Phase-Diagram of Wollastonite-Tricalcium Phosphate," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 78, no. 6, pp. 1653-1656, 1995.
- [2] C. Ohtsuki, T. Kokubo, and T. Yamamuro, "Mechanism of Apatite Formation on Cao-SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> Glasses in A Simulated Body-Fluid," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 143, no. 1, pp. 84-92, 1992.
- [3] Z. Strnad, "Role of the Glass Phase in Bioactive Glass-Ceramics," *Biomaterials*, vol. 13, no. 5, pp. 317-321, 1992.
- [4] J. F. Navarro, "El vidrio," Spain: 2003, p. 270.
- [5] V. Cannillo, J. Colmenares-Angulo, L. Lusvardi, F. Pierli, and S. Sampath, "In vitro characterisation of plasma-sprayed apatite/wollastonite glass-ceramic biocoatings on titanium alloys," *Journal of the European Ceramic Society*, vol. 29, no. 9, pp. 1665-1677, 2009.
- [6] H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. Gonzalez, B. Leon, N. Almeida, S. Cachinho, E. J. C. Davim, R. Correia, J. M. Oliveira, and M. H. V. Fernandes, "Orthophosphate nanostructures in SiO<sub>2</sub>-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-MgO bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, no. 34, pp. 4075-4080, 2008.
- [7] A. J. Salinas, J. Roman, M. Vallet-Regi, J. M. Oliveira, R. N. Correia, and M. H. Fernandes, "In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO center dot P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-CaO center dot SiO<sub>2</sub>-CaO center dot MgO center dot 2SiO(2) system," *Biomaterials*, vol. 21, no. 3, pp. 251-257, 2000.
- [8] P. G. Galliano, J. M. P. Lopez, E. L. Varet, I. Sobrados, and J. Sanz, "Analysis by Nuclear-Magnetic-Resonance and Raman Spectroscopies of the Structure of Bioactive Alkaline-Earth Silicophosphate Glasses," *Materials Research Bulletin*, vol. 29, no. 12, pp. 1297-1306, 1994.
- [9] I. Elgayar, A. E. Aliev, A. R. Boccaccini, and R. G. Hill, "Structural analysis of bioactive glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 351, no. 2, pp. 173-183, 2005.
- [10] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Mechanical-Properties of A New Type of Apatite-Containing Glass Ceramic for Prosthetic Application," *Journal of Materials Science*, vol. 20, no. 6, pp. 2001-2004, 1985.
- [11] L. L. Hench and J. Wilson, *An introduction to bioceramics*. London: 1993.
- [12] P. N. De Aza, A. H. De Aza, P. Pena, and S. De Aza, "Bioactive glasses and glass-ceramics," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 46, no. 2, pp. 45-55, 2007.
- [13] H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. Gonzalez, B. Leon, F. Malz, and C. Jager, "Raman and NMR study of bioactive Na<sub>2</sub>O-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, no. 45-46, pp. 5004-5008, 2008.
- [14] W. Vogel, "Structure and crystallization of glasses," Leipzig, Germany: Pergamon Press, 1971, p. 246.



- [15] E. Navarro, "Prácticas de Física," Universidad Politécnica de Valencia, 2009, pp. 129-130.

## **CAPÍTULO VI**

### **ESTUDIO DE LA DESVITRIFICACIÓN DEL VIDRIO EUTÉCTICO**



## VI. ESTUDIO DE LA DESVITRIFICACIÓN DEL VIDRIO EUTÉCTICO<sup>1</sup>

### VI.1. Introducción

En este capítulo se discute el proceso de desvitrificación del vidrio eutéctico del sistema W-TCP, como un estado preliminar para establecer una nueva ruta para la obtención de materiales vitrocerámicos nano-estructurados con mejores propiedades mecánicas que el vidrio. Los resultados obtenidos se han clasificado desde un punto de vista no-isotérmico e isotérmico, dependiendo de las técnicas experimentales usadas o de los tratamientos térmicos realizados.

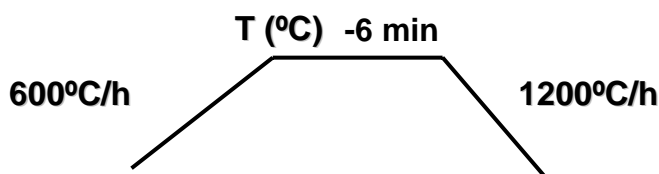
### VI.2. Estudio no-isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico

#### VI.2.1. Análisis térmico diferencial (ATD)

En el capítulo V, se muestra el ATD para el vidrio en masa (figura 5.12B). Con el objetivo de identificar los distintos efectos térmicos observados se realizaron tratamientos térmicos al vidrio en masa a diferentes temperaturas.

#### VI.2.3. Tratamientos Térmicos

Los tratamientos térmicos se realizaron a bloques de vidrio, que fueron obtenidos por corte con un disco de diamante, obteniendo muestras de  $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ . Las muestras, colocadas en crisoles de platino se trataron térmicamente en aire, en un horno eléctrico, a diferentes temperaturas (entre  $900^\circ\text{C}$  y  $1375^\circ\text{C}$ , inferiores a la temperatura de fusión teórica del vidrio  $1402 \pm 3^\circ\text{C}$  [1]). El ciclo térmico usado para los tratamientos térmicos se muestra en la figura 6.1.



**Figura 6.1.** Ciclo térmico seguido para identificar los picos exotérmicos del ATD (figura 5.12B).

<sup>1</sup>Partes de este capítulo se han publicado en:

- **Acta Biomaterialia**. Vols 5, pp 3057–66 (2009).

- **BIOCERAMICS 21**, Key Engineering Materials. Vols. 396-398, pp 127-130 (2009).

Después de los tratamientos térmicos, se determinó la densidad de las muestras y se identificaron y cuantificaron las fases presentes mediante difracción de rayos X y análisis Rietveld, igualmente se observaron las muestras por MEB-EC con el fin de estudiar la microestructura de las mismas.

#### VI.2.3.1.Densidad

La densidad aparente de las muestras con tratamiento térmico se determinó usando el método de Arquímedes, los resultados se muestran en la tabla VI.1, también se muestra el valor del vidrio original.

**Tabla VI.1.**

*Valores de densidad para las muestras con tratamiento térmico, determinados mediante el método de Arquímedes.*

Muestra-Tratamiento térmico	Densidad ( g cm <sup>-1</sup> )
Vidrio	2,91±0,02
900 °C - 6min	2,98±0,03
1100 °C - 6min	3,00±0,03
1250 °C - 6min	2,94±0,03
1375 °C - 6min	2,89±0,02

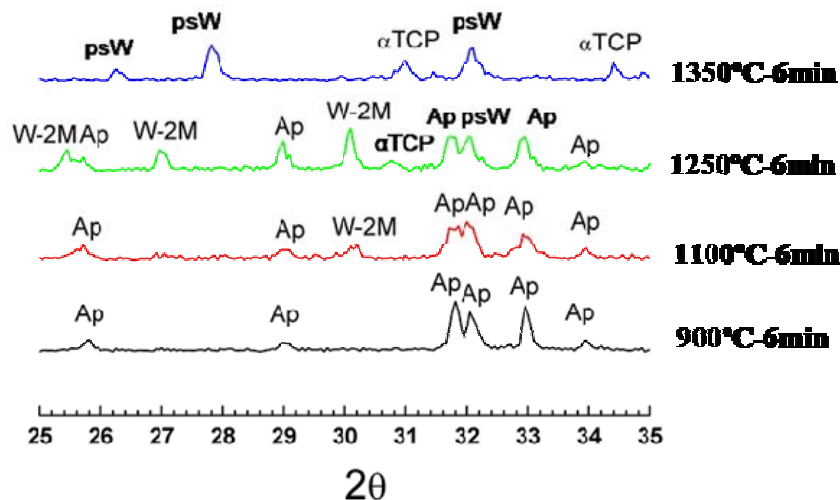
Se observa una variación de la densidad con el tratamiento térmico que se atribuye a las diferentes fases cristalinas formadas a cada temperatura.

#### VI.2.3.2.Difracción de Rayos X y análisis mediante la metodología Rietveld

En la figura 6.2 se presentan los resultados de DRX a temperatura ambiente para las muestras con tratamientos térmicos, donde es posible observar la evolución de las fases presentes con la temperatura, en el rango de 900 - 1375°C para un tiempo de permanencia a cada temperatura de 6 min. A 900°C solo se identifica la fase cristalina apatita deficiente en calcio (Ap dCa en adelante<sup>2</sup>). A 1100°C se detecta la presencia de Ap dCa y wollastonita-2M (W-2M en adelante). Mientras que a 1250°C las fases cristalinas identificadas fueron: Ap dCa, W-2M, pseudowollastonita (CaSiO<sub>3</sub>=ps-W)[2;3] y  $\alpha$ -fosfato

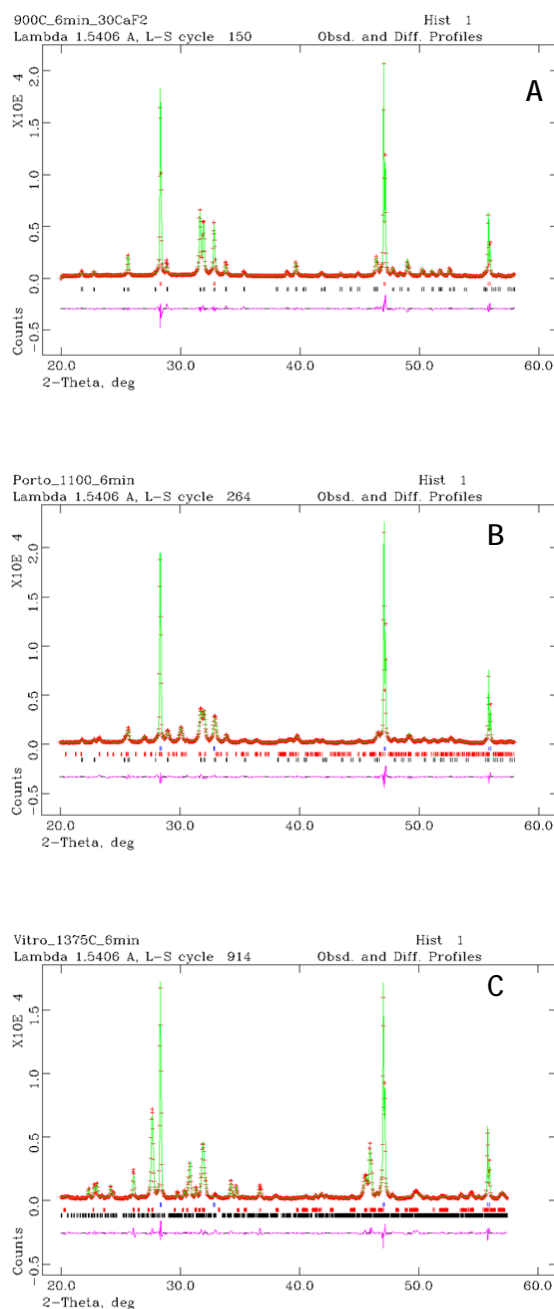
<sup>1</sup> En algunas figuras se usará Ap.

tricálcico ( $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2 = \alpha\text{-TCP}$ ) [4;5] y finalmente, a 1375°C sólo fueron detectadas dos fases cristalinas, ps-W y  $\alpha\text{-TCP}$ .



**Figura 6.2.** Resultados de DRX a temperatura ambiente, obtenidos después de tratamientos térmicos a 900, 1100, 1250 y 1375°C, con un tiempo de permanencia a cada temperatura de 6 min. (Ap: Apatita deficiente en calcio; W-2M: wollastonita-2M; psW: pseudowollastonita;  $\alpha\text{-TCP}$ :  $\alpha$ -fosfato tricálcico)

En la figura 6.3 y en la tabla VI.2, se observan los resultados de los refinamientos Rietveld con el programa GSAS (General Structure Analysis System) [6] para las muestras tratadas térmicamente a 900°C, 1100°C y 1375°C, durante 6 min. Para este estudio se ha usado un estándar interno sin fase amorfa,  $\text{CaF}_2$ . El contenido de fase amorfa total de las muestras analizadas ha sido determinado a partir de la fracción de  $\text{CaF}_2$  y de las fases cristalinas presentes, obtenidas directamente del estudio Rietveld, luego fueron renormalizadas teniendo en cuenta la fracción total de las fases no difractantes [7]. Los valores obtenidos para el factor de desacuerdo ( $R_{\text{wp}}$ ) [8] y el factor de ajuste para cada fase ( $R_f$ ) estuvieron por debajo del 10%, lo que indica un ajuste correcto y confiable de los datos. Como era de esperar, la cantidad de fase amorfa disminuye con la temperatura de tratamiento térmico. No se ha realizado el ajuste Rietveld a la muestra de 1250°C, ya que presenta cuatro fases cristalinas, y no se ha considerado prioritario para el presente estudio.



**Figura 6.3.** Refinamientos Rietveld (18-59°/2 $\theta$ ) obtenidos mediante el programa GSAS [9], para el análisis de la muestras tratadas térmicamente, se muestra el difractograma observado (cruces), calculado (línea) y la diferencia entre ambos (línea inferior). Las marcas presentes corresponden a los índices de Bragg de cada fase. Fichas ICSD usadas para identificar las fases: (A) Muestra 900°C 6min<sup>-1</sup>: 152190=Ca<sub>9,303</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>0,606</sub>I,97(H<sub>2</sub>O) (marcas inferiores), 82707=CaF<sub>2</sub>. (B) Muestra 1100°C 6min<sup>-1</sup>: 152190=Ca<sub>9,303</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>0,606</sub>I,97(H<sub>2</sub>O) (marcas inferiores), 82707=CaF<sub>2</sub> y 34908= CaSiO<sub>3</sub> (marcas superiores). (C) Muestra 1375°C 6min<sup>-1</sup>: 923=Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (marcas inferiores), 82707= CaF<sub>2</sub> y 26553= CaSiO<sub>3</sub> (marcas superiores) [6;9-13]

**Tabla VI.2.**

*Resultado del refinamiento Rietveld para las muestras con tratamientos térmicos*

		Tratamientos térmicos		
		900°C 6min <sup>-1</sup>	1100°C 6min <sup>-1</sup>	1375°C 6min <sup>-1</sup>
<b>Refinamiento Rietveld</b>  <b>Índices de calidad (GSAS)</b>	Rwp	9,0%	8,6%	9,8%
	Rf Patrón	5,8%	3,8%	2,4%
	Rf Ap dCa	7,7%	4,1%	-
	Rf W-2M	-	5,3%	-
	Rf $\alpha$ -TCP	-	-	9,8%
	Rf psW	-	-	6,4%
<b>Análisis Cuantitativo (%Peso)</b>	Fase amorfa	59,3 $\pm$ 0,4	44,5 $\pm$ 0,5	27,7 $\pm$ 0,6
	Ap dCa	40,7 $\pm$ 0,6	34,6 $\pm$ 0,7	-
	W-2M	-	20,9 $\pm$ 0,8	-
	$\alpha$ -TCP	-	-	35,7 $\pm$ 0,8
	psW	-	-	36,6 $\pm$ 0,7

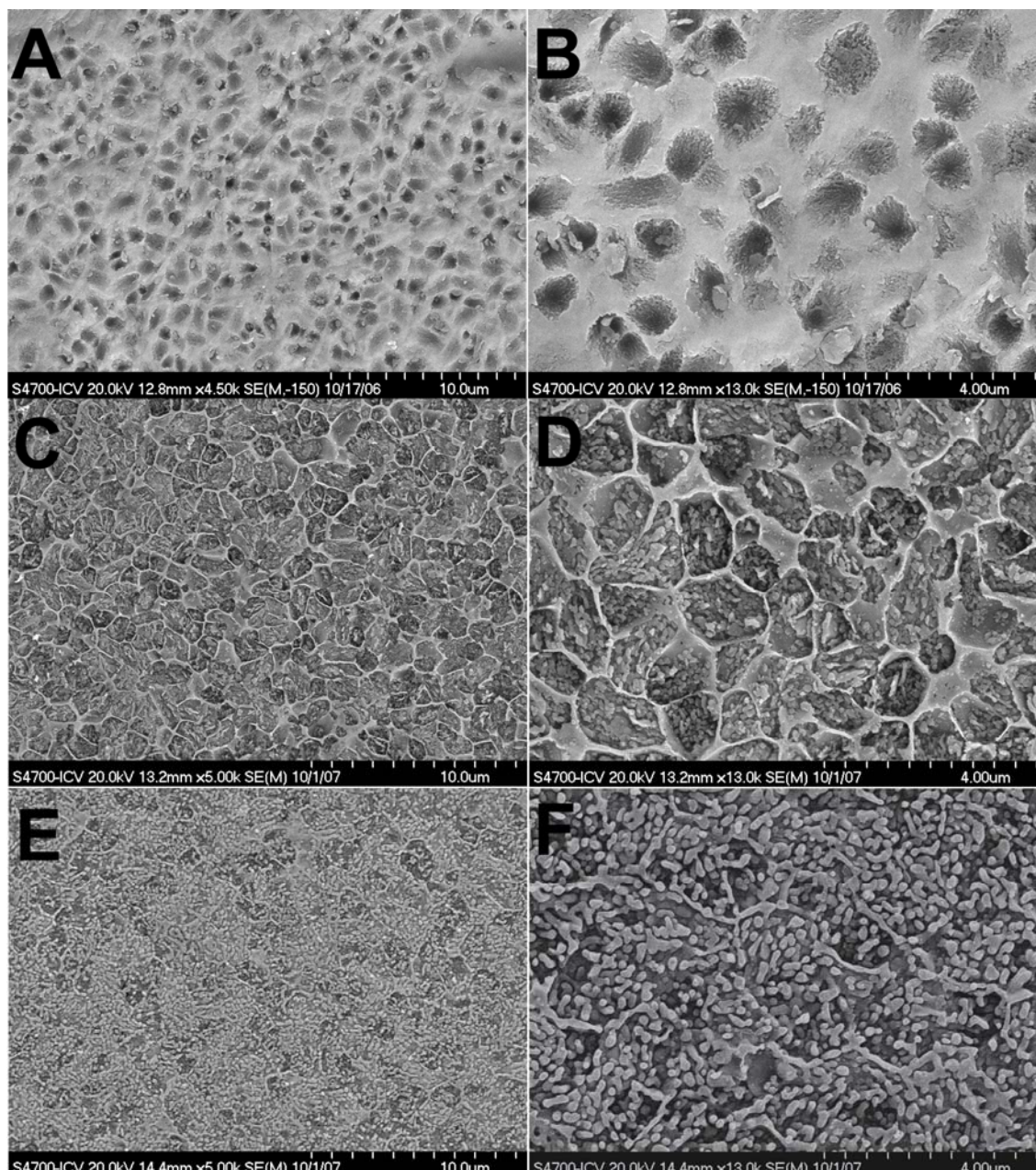
(Ap dCa: Apatita deficiente en calcio; W-2M: wollastonita-2M; ps-W: pseudowollastonita;  $\alpha$ -TCP:  $\alpha$ -fosfato tricálcico)

### VI.2.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Después de los tratamientos térmicos las muestras fueron embutidas, en una resina epoxi de fraguado a temperatura ambiente para su posterior pulido. Con el fin de revelar la microestructura fue necesario atacar la superficie de las muestras con ácido acético al 5% v/v durante 1 s.

En las figuras 6.4 y 6.5 se presentan algunas de las micrografías obtenidas mediante MEB-EC mostrando las microestructuras típicas de las muestras con tratamientos térmicos a distintas temperaturas.





**Figura 6.4.** Superficie de las muestras con ataque químico. (A y B) Muestra tratada a  $900^{\circ}\text{C}$   $6\text{ min}^{-1}$ : fase amorfa y cristales submicrométricos de Ap dCa. (C y D) Muestra tratada a  $1100^{\circ}\text{C}$   $6\text{ min}^{-1}$ : Ap dCa y cristales de W-2M con una fase amorfa interconectada. (E y F) Muestra tratada a  $1250^{\circ}\text{C}$   $6\text{ min}^{-1}$ : mezcla homogénea de cristales de Ap dCa, W-2M y ps-W, también se observa una fase amorfa residual.

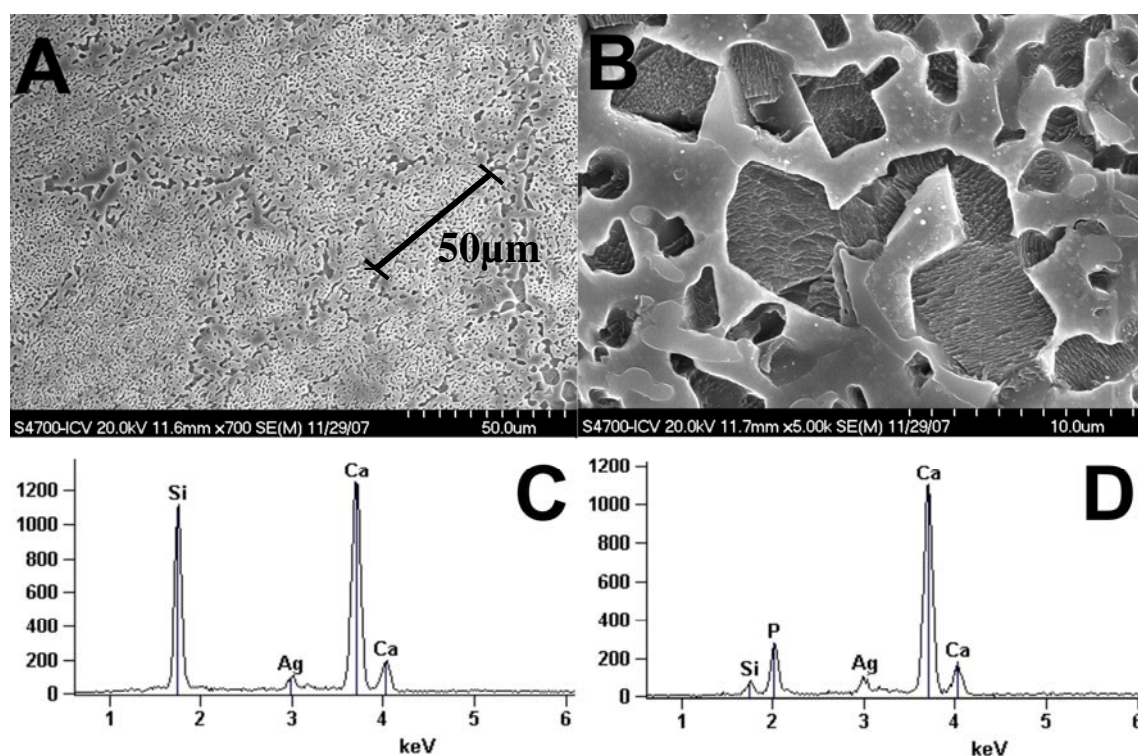
La muestra tratada a  $900^{\circ}\text{C}$   $6\text{ min}^{-1}$ , presenta una microestructura homogénea (figuras 6.4 A y B), formada por colonias ( $\sim 1\mu\text{m}$ ) de una fase con alto ataque químico, fase oscura en la figura, y una fase gris clara continua. La fase oscura está formada por cristales submicrónicos de Ap dCa, mientras que la fase continua interconectada corresponde a la fase amorfa residual.

La microestructura de la muestra tratada a  $1100^{\circ}\text{C}$   $6\text{min}^{-1}$  se muestra en las figuras 6.4 C y D. Después del ataque químico, nuevamente se revela una microestructura homogénea formada por colonias de  $\sim 2\mu\text{m}$ . Estas colonias están formadas por una fase amorfa continua interconectada (fase gris clara), que encierra una mezcla homogénea de cristales nanométricos de Ap dCa y W-2M (véase resultados de DRX figura 6.3).

La muestra tratada a  $1250^{\circ}\text{C}$   $6\text{min}^{-1}$  (figuras 6.4 E y F) presenta una microestructura similar que la tratada a  $1100^{\circ}\text{C}$ , pero con una fase amorfa menos abundante y no interconectada, observándose cristales submicrónicos de Ap dCa, W-2M y psW (véase resultados de DRX figura 6.3).

Finalmente, la microestructura de la muestra tratada a  $1375^{\circ}\text{C}$  se presenta en la figura 6.5. Mediante MEB-EC-EDS se observa que la muestra atacada presenta una microestructura formada por colonias ( $\sim 50\mu\text{m}$ ) cuasi-esféricas. Estas presentan una fase interconectada de psW, la cual encierra cristales dispersos de  $\alpha$ -TCP con tamaños cercanos a  $\sim 4\mu\text{m}$  (véase difractograma de DRX en la figura 6.3). Como se esperaba, la morfología del material corresponde a una estructura eutéctica irregular. Esta es similar a la microestructura de los materiales Bioeutéticos, obtenidos mediante una solidificación controlada de la composición eutéctica [14-16] (ver capítulo II, figura 2.1). La fase ps-W rellena las regiones adyacentes entre colonias figura 6.5 A. Esto está de acuerdo con la alta fracción de volumen (0,61) en la composición eutéctica del diagrama de fase W-TCP [1].

Los microanálisis semicuantitativos realizados con el analizador EDS (figura 6.5 C y D), confirman que la fase continua de color gris es psW (figura 6.5 C), mientras que la zona oscura corresponde al  $\alpha$ -TCP (figura 6.5 D). Los picos del análisis EDS correspondientes a la plata (Ag) provienen del recubrimiento realizado a las muestras, requerido para los estudios en MEB-EC-EDS. Teniendo en cuenta la precisión del método y la desviación estándar para cinco microanálisis en la zona de la psW (% en peso:  $48 \pm 2$   $\text{SiO}_2$  y  $52 \pm 3$   $\text{CaO}$ ), se observa que la composición está cercana a los valores estequiométricos (% en peso:  $51,7$   $\text{SiO}_2$  y  $48,3$   $\text{CaO}$ ). Por otro lado, desde el punto de vista de la reproducibilidad y de la estequiometría, los microanálisis realizados a la zona de  $\alpha$ -TCP tiene una alta tasa de error ( $> 10\%$ ) debido a la precisión del método y al ataque químico. Esto último altera la composición original (% en peso  $45,8$   $\text{P}_2\text{O}_5$  y  $54,2$  de  $\text{CaO}$ ) del análisis, pero confirma la presencia de la fase  $\alpha$ -TCP obtenida por DRX (véase figura 6.3). Los análisis EDS confirman la presencia de pequeñas cantidades de silicio en la fase  $\alpha$ -TCP (figura 6.5 D).

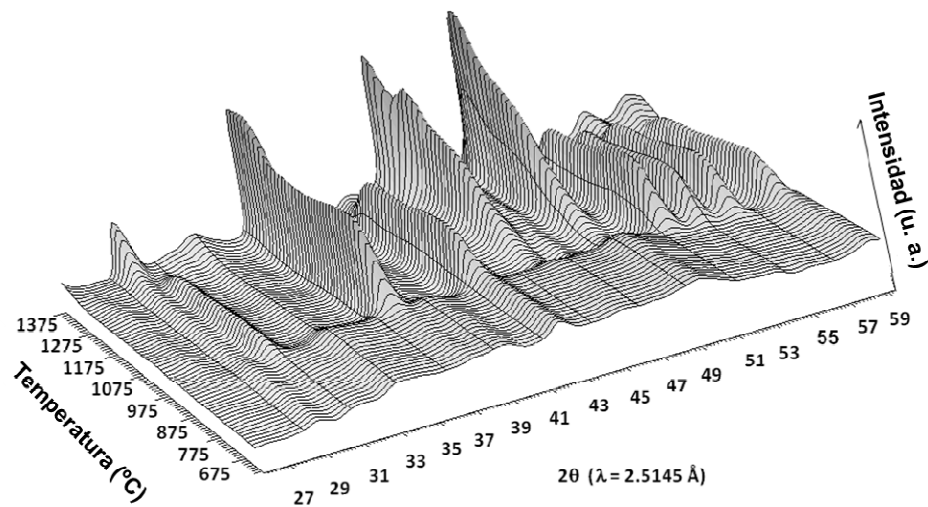


**Figura 6.5.** Superficie atacada químicamente con ácido acético 5% vol., de las muestras tratadas a 1375°C. Estudiadas mediante MEB-EC-EDS. (A y B) Muestra tratada a 1375°C 6 min<sup>-1</sup> en aire. (A) Colonias redondeadas de pseudowollastonita y α-fosfato tricálcico. (B) Detalle de las colonias. (C y D) Análisis EDS: de la fase gris interconectada, ps-W (C) y de la fase oscura (D). Ver texto para detalles.

### VI.2.3. Difracción de neutrones

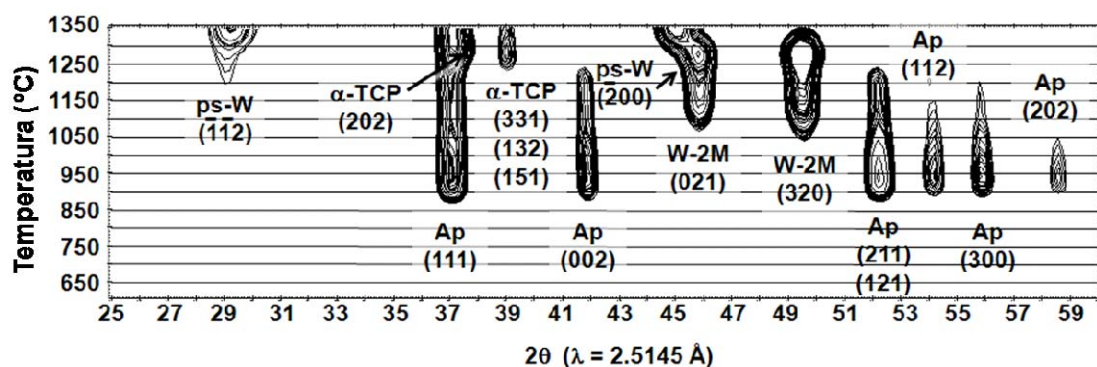
Mediante difracción de neutrones (DN) se ha estudiado la evolución en tiempo real, de la cristalización no-isotérmica del vidrio eutéctico W-TCP en vacío. La representación de los datos en tres dimensiones y la proyección bidimensional, fue realizada con el programa NOESYS [9]. Los datos obtenidos de la DN durante el ciclo de calentamiento, fueron representados como una secuencia de difractogramas, en una representación tridimensional, en donde el eje X corresponde al ángulo de difracción  $2\theta$ , el eje Y a la temperatura y el Z a la intensidad relativa (figura 6.6).





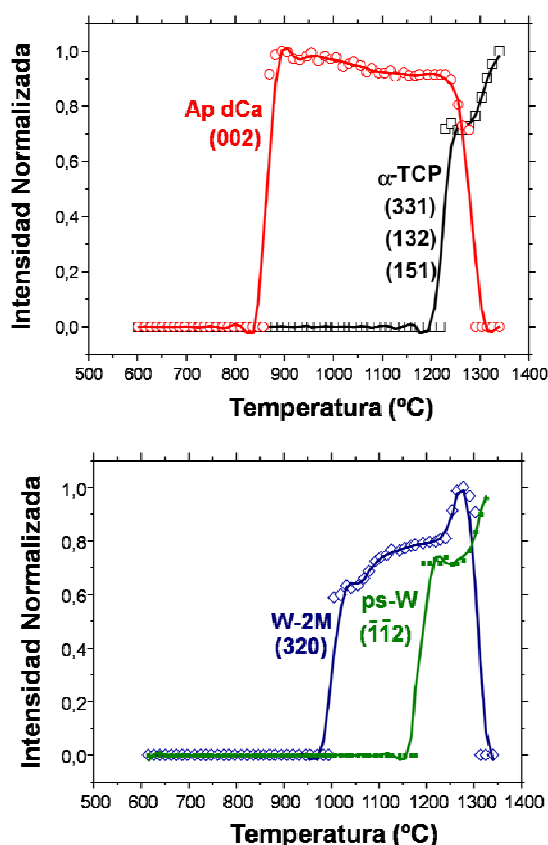
**Figura 6.6.** Evolución en tiempo real de la nucleación y cristalización no isotérmica del vidrio eutéctico W-TCP. Resultados obtenidos de la difracción de neutrones realizada desde 600°C hasta 1375°C a 5°C min<sup>-1</sup>. Ver figura 6.7 y texto del trabajo para detalles.

Para visualizar con mayor precisión las diferentes etapas de cristalización y desaparición de las fases, se ha proyectado el dibujo en 3 dimensiones (3D) sobre los ejes de temperatura y  $2\theta$ . La existencia de las distintas fases se ha indicado rotulando los diferentes picos de difracción, tal como se muestra en la figura 6.7, con sus correspondientes índices de Miller.



**Figura 6.7.** Proyección de la figura en 3D (figura 6.6) sobre los ejes de temperatura y ángulo. Se puede visualizar fácilmente los eventos de cristalización y desaparición de las fases. (Ap: apatita deficiente en calcio (Ap dCa); W-2M: wollastonita-2M; ps-W: pseudowollastonita;  $\alpha$ -TCP:  $\alpha$ - fosfato tricálcico)

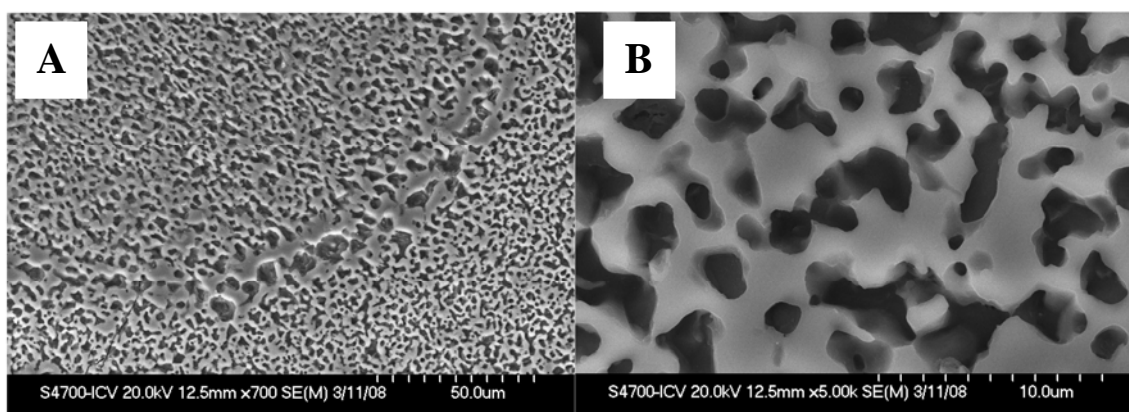
Se ha realizado un análisis semi-cuantitativo mediante la selección y separación de aquellos picos de difracción que no solapaban con otras fases. Las intensidades integradas de estos picos fueron normalizadas a uno. Para la Ap dCa, fue seleccionado el pico de difracción correspondiente a la reflexión (002), la variación de la intensidad del pico se ha representado en función de la temperatura para determinar cuando ocurren los procesos de cristalización y desaparición de las fases (figura 6.8).



**Figura 6.8.** (A) Intensidades, obtenidas de la difracción de neutrones, integradas y normalizadas, representadas en función de la temperatura. Direcciones planares usadas: Ap dCa (002); para el  $\alpha$ -TCP (331), (132) y (151). (B) Intensidades, obtenidas de la difracción de neutrones, integradas y normalizadas, representadas en función de la temperatura. Direcciones planares usadas: (320) para W-2M, y (-1 -1 2) para ps-W. (Ap dCa: Apatita deficiente en calcio; W-2M: wollastonita-2M; ps-W: pseudowollastonita;  $\alpha$ -TCP:  $\alpha$ -fosfato tricálcico)

Las reflexiones (151), (132) y (331) fueron seleccionadas para el  $\alpha$ -TCP y las reflexiones (320) y (-1 -1 2) para la W-2M y ps-W, respectivamente. Sus variaciones con respecto a la temperatura se han representado en la figura 6.8 A y B.

En la figura 6.9 se muestra la microestructura después del estudio por DN hasta 1375 °C (ha sido necesario atacar la superficie con ácido acético al 5%). De los datos de DN (véase figura 6.7 y 6.8) se confirma la presencia de ps-W y  $\alpha$ -TCP al final del ensayo (1375 °C) y al estudiar la microestructura de la muestra por MEB-EC-EDS se observa una gran similitud con la presentada por la muestra tratada en aire a 1375°C 6min<sup>-1</sup> (figura 6.5 A y B). La muestra presenta una microestructura formada por colonias de ~200µm, que contienen granos de  $\alpha$ -TCP y ps-W de ~3µm.



**Figura 6.9.** (A-B) Micrografías de la superficie de la muestra después del ensayo de DN.

#### **VI.2.4.Discusión**

Con todos los resultados obtenidos se puede establecer el proceso de cristalización no-isotérmico del vidrio eutéctico W-TCP, entre el rango de temperatura ambiente y 1375°C, de la siguiente forma:

1. Cuando el vidrio es calentado en aire, la primera fase que cristaliza y crece en el vidrio en condiciones de no-equilibrio es una apatita deficiente en calcio (véase figura 6.2). La cristalización del vidrio es principalmente en volumen. Este es el mismo comportamiento observado para el ensayo realizado en vacío (figura 6.7). Estudios de espectroscopia IR de diferentes vidrios [17-21] indican que el agua puede estar presente en el vidrio en forma adsorbida y como grupos OH. Existen diferentes causas de la presencia de grupos OH en un vidrio, por ejemplo: el desorden estructural, la adsorción, la presencia de agua higroscópica en las materias primas, la presencia de agua de constitución en las materias primas, y la incorporación a la masa fundida de

vidrio de grupos -OH provenientes de la atmósfera del horno durante la fusión. La fase Ap dCa inicia su cristalización a  $\sim 870^{\circ}\text{C}$  (figuras 6.6, 6.7 y 6.8 A), y se presenta como una reacción marcadamente exotérmica que se registra como un pico en el ATD, que presenta su máximo a  $\sim 925^{\circ}\text{C}$  (capítulo V, figura 5.11 B). Los cristales de Ap dCa precipitan uniformemente en forma de cristales nanométricos desde el vidrio (figura 6.4 A y B). Esta fase se forma porque su  $\Delta G$  es la más baja de todos los posibles compuestos.

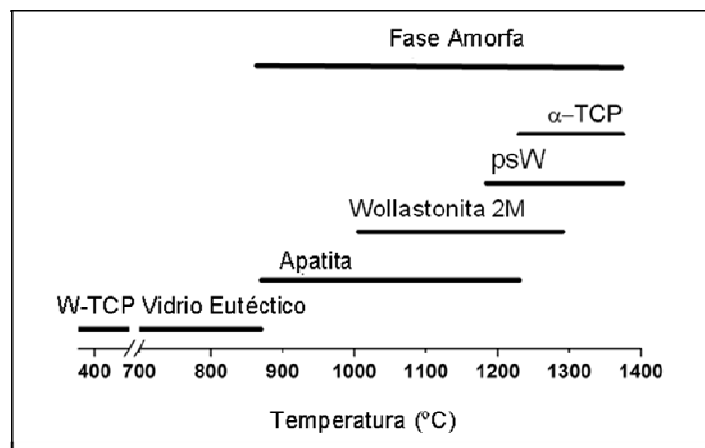
2. La segunda fase que cristaliza es la wollastonita-2M. De los resultados de difracción de neutrones (figuras 6.6 y 6.7) se determina que la W-2M aparece a  $\sim 1006^{\circ}\text{C}$  (véase también figura 6.8). Esta cristalización se registra en el ATD como un pico exotérmico pequeño y ancho, que alcanza su máximo a  $\sim 1080^{\circ}\text{C}$  (capítulo V, figura 5.11 B). Los cristales de  $\sim 20\text{nm}$  de W-2M nuclean desde la fase amorfa residual.
3. A  $\sim 1185^{\circ}\text{C}$  comienza la cristalización de la fase pseudowollastonita (figuras 6.7 y 6.8 B). Este fenómeno es registrado en el ATD como una reacción exotérmica que presenta su máximo de intensidad a  $\sim 1143^{\circ}\text{C}$  (capítulo V, figura 5.11 B). La evolución de las intensidades de las reflexiones (3 2 0) para la W-2M y (-1 -1 2) para la psW, con respecto a la temperatura (figura 6.8 B), demuestra que la fase ps-W se forma directamente desde la fase amorfa residual y desde la fase W-2M (fase wollastonita de baja temperatura), esta última como consecuencia de una transformación polimórfica. Durante el proceso de cristalización las fases W-2M y ps-W, coexisten en condiciones de no-equilibrio en el rango de  $\sim 1185$  y  $\sim 1303^{\circ}\text{C}$  (figuras 6.7 y 6.8 B).
4. A  $\sim 1230^{\circ}\text{C}$  se detecta el primer pico de difracción del  $\alpha$ -TCP, esta fase se forma desde la apatita deficiente en calcio, fase metaestable, como se muestra en la figura 6.8 A. Toda la apatita se descompone a temperaturas cercanas a los  $\sim 1291^{\circ}\text{C}$  (figuras 6.7 y 6.8), transformación que ocurre rápidamente. La cristalización del  $\alpha$ -TCP se detecta en el ATD como un efecto exotérmico que presenta una intensidad máxima a  $\sim 1283^{\circ}\text{C}$  (capítulo V, figura 5.11 B).
5. La cristalización del vidrio produce en la muestra variaciones de densidad, que dependen del tratamiento térmico (véase tabla VI.I), estos datos son coherentes con los obtenidos para la microscopía de calefacción (capítulo V, figura 5.13), donde se observa una contracción ( $\sim 873$ - $891^{\circ}\text{C}$ ) o una dilatación de la muestra ( $\sim 1291$ - $1402^{\circ}\text{C}$ ). El primer fenómeno coincide con la cristalización de la Ap dCa, fase con una densidad

mayor que el vidrio, mientras que el segundo corresponde con varios efectos: la descomposición total de la apatita ( $\sim 1291^{\circ}\text{C}$ ) y la transformación total de W-2M a ps-W ( $\sim 1303^{\circ}\text{C}$ ).

6. La cristalización de las fases en el vidrio ocurren en volumen, por otro lado es bien sabido que la presencia de  $\text{P}_2\text{O}_5$  en vidrios de silicato promueve la nucleación en volumen[22].

Se ha encontrado que partiendo de la composición eutéctica es posible obtener un amplio rango de vitrocerámicos de composición eutéctica, compuesto por diferentes fases cristalinas y proporciones de éstas, mediante un apropiado tratamiento térmico.

La figura 6.10 muestra el mecanismo de desvitrificación establecido desde los resultados no-isotérmicos obtenidos en esta sección.



**Figura 6.10.** Mecanismo de desvitrificación no-isotérmico para el vidrio eutéctico del sistema W-TCP.

### VI .3.Estudio isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico

El estudio isotérmico de la desvitrificación del vidrio eutéctico fue realizado con el fin de determinar el diagrama temperatura-tiempo-transformación, para ello se ha tratado térmicamente el vidrio a diferentes temperaturas durante diferentes tiempos, siguiendo el ciclo térmico de la figura 6.11, después las muestras fueron estudiadas mediante DRX-Rietveld, MEB-EDS y MET-DAS, con el objetivo de determinar las variaciones de los porcentajes de fases presentes y la microestructura con el tratamiento térmico.

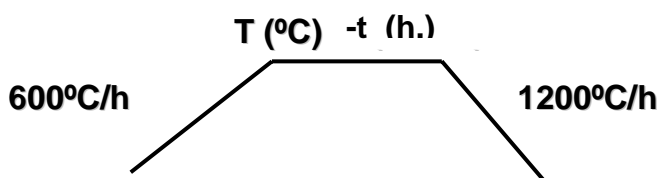


### VI.3.1. Determinación de la zona opal

Para determinar la zona opal, que en el presente trabajo se refiere a la región donde las muestras presentan un difractograma de rayos X amorfo, sin ningún pico de cristalización, pero que han perdido su translucidez, lo que indica que la muestra presenta núcleos de fases cristalinas o separación de fases; se realizaron tratamientos térmicos a temperaturas menores a 870°C.

Las muestras usadas para el tratamiento térmico han sido obtenidas de una pieza de vidrio; la cual se ha cortado en cubos ( $5 \times 5 \times 5 \text{ mm}^3$ ) con una cortadora con disco de diamante, las muestras obtenidas se pulieron a mano con lijas de SiC de diferentes tamaños de grano y para finalizar se han pulido con una suspensión de Cerio.

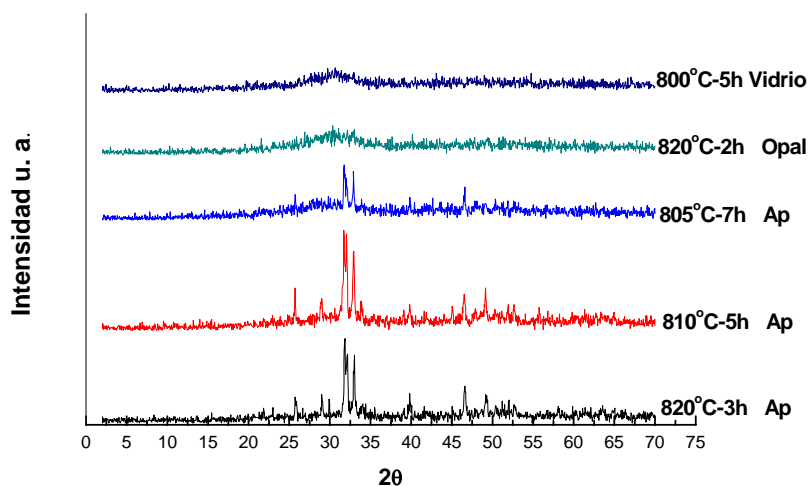
El ciclo térmico seguido se muestra en la figura 6.11, caracterizado por un calentamiento y enfriamiento rápido. Siguiendo los resultados obtenidos, en la sección anterior, para los estudios no-isotérmicos se han estudiado temperaturas inferiores a 870°C, ya que a temperaturas mayores ya ha cristalizado la fase Ap dCa.



**Figura 6.11.** Ciclo térmico seguido para los tratamientos térmicos

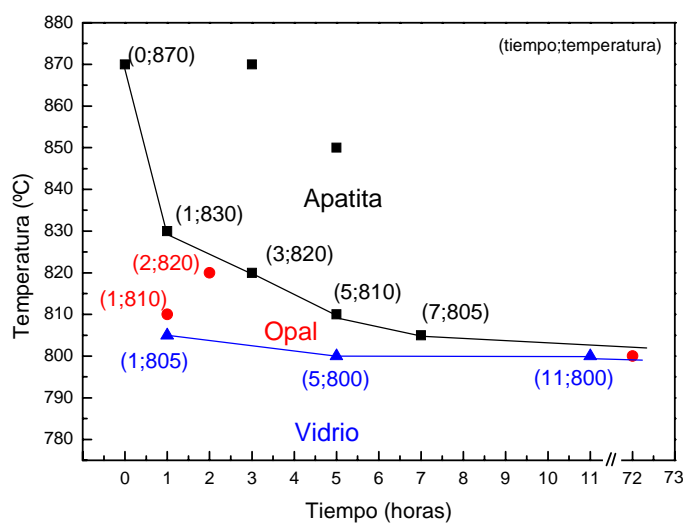
Después del tratamiento térmico parte de las muestras fueron molidas, con el fin de realizar estudios mediante DRX, los resultados se muestran en la figura 6.12. Se puede observar en los difractogramas correspondientes a las muestras tratadas a 810 durante 1h y 820 durante 2h un pico ancho, característico de los vidrios de sílico-fosfatos-alcalinotérreos, lo que indica la estructura amorfa y desordenada de las muestras. Las características visuales de las muestras indican que algunas presentan una apariencia opal, mientras que otras siguen siendo totalmente transparentes. Estos resultados se representan en la figura 6.13, donde es posible observar tres regiones diferentes (vidrio, opal y apatita). En la zona rotulada vidrio

se encuentran situadas las muestras que han presentado un difractograma de rayos X amorfo y sin cambios visuales (transparente), mientras que en la zona opal se encuentran las muestras que presentan un difractograma amorfo, pero a la vista son opales. La zona apatita corresponde a las muestras que presentan un difractograma de rayos X de Ap dCa.

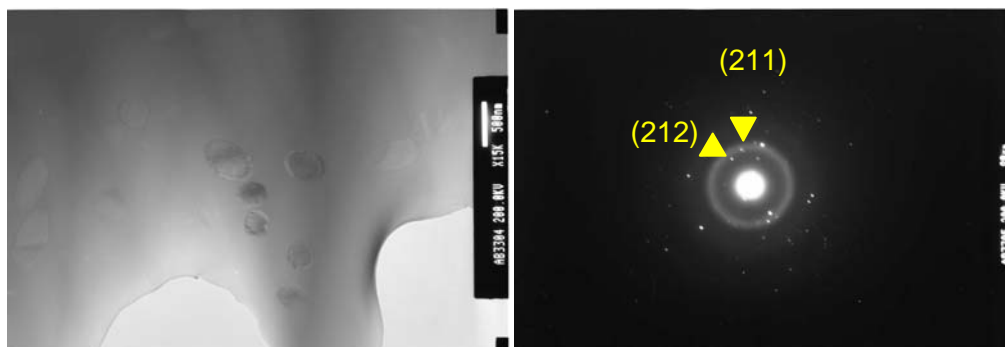


**Figura 6.12.** Resultados de DRX, obtenidos después de los tratamientos térmicos a temperaturas menores a 870°C y diferentes tiempos.

Para comprobar que las muestras opales presentan cristales nanométricos de una fase cristalina, se ha observado la muestra de 820°C-2h en un MET-DAS, los resultados indican (figura 6.14) que la muestra presenta núcleos (tamaño promedio ~ 300nm), se ha determinado por MET-DAS que estos núcleos son del tipo apatita.



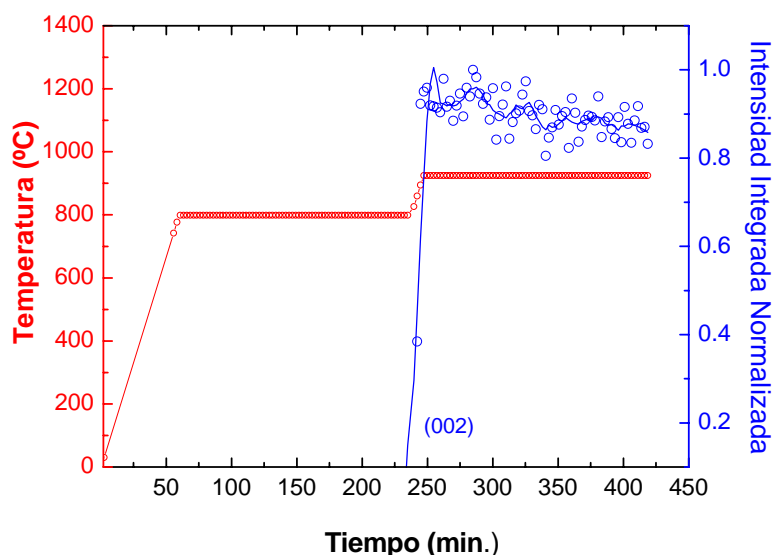
**Figura 6.13.** Diagrama temperatura-tiempo-transformación donde se muestran las zonas: vidrio, opal y cristalizada. Valores en paréntesis corresponden a: tiempo(h.);temperatura (°C).



**Figura 6.14.** Micrografías y análisis DAS de la muestra tratada a 820°C 2h<sup>-1</sup>, obtenidas por MET.

Con el objetivo de comprobar la zona opal, se ha realizado un estudio de nucleación y crecimiento mediante DN, para lo cual se sometió, a una muestra en bloque, al ciclo térmico que se muestra en la figura 6.15 (línea roja), que incluye un tratamiento de nucleación a 800°C ( $T_g + 10^\circ\text{C}$ ) durante 3 horas y un tratamiento de crecimiento a 900°C ( $T_C$  según ATD) de 3 horas. De los difractogramas obtenidos se ha estudiado la evolución del plano (002) de apatita. La intensidad de este pico se ha integrado y normalizado, este valor se ha representado en función del tiempo, el resultado es la línea azul de la figura 6.15. Es posible observar que la aparición de la fase apatita ocurre a  $\sim 867^\circ\text{C}$ , es decir que con el tratamiento térmico de nucleación elegido a 800°C-3h no se ha logrado disminuir

significativamente la temperatura de aparición de la fase apatita ( $\sim 870^\circ\text{C}$  sin tratamiento de nucleación, véase figura 6.8), lo que indica que a  $800^\circ\text{C}$ -3h no se han formado núcleos de fase cristalina, que logren disminuir la temperatura de aparición de la apatita, confirmando los datos recogidos en la figura 6.13.



**Figura 6.15** Intensidad, obtenidas de la difracción de neutrones, integrada y normalizada, representada en función del tiempo (Línea Azul), plano estudiado: (002). Ciclo térmico seguido de nucleación y crecimiento (Línea Roja).

Igualmente se ha demostrado que para temperaturas menores a  $810^\circ\text{C}$  el tiempo necesario para obtener una muestra opal, es decir, que presente núcleos de fases cristalinas, es muy alto, llegando por ejemplo a 72 horas para las muestras tratadas a  $800^\circ\text{C}$ . El tamaño que presentan los núcleos para esta muestra es  $\sim 400$  nm, figura 6.16.

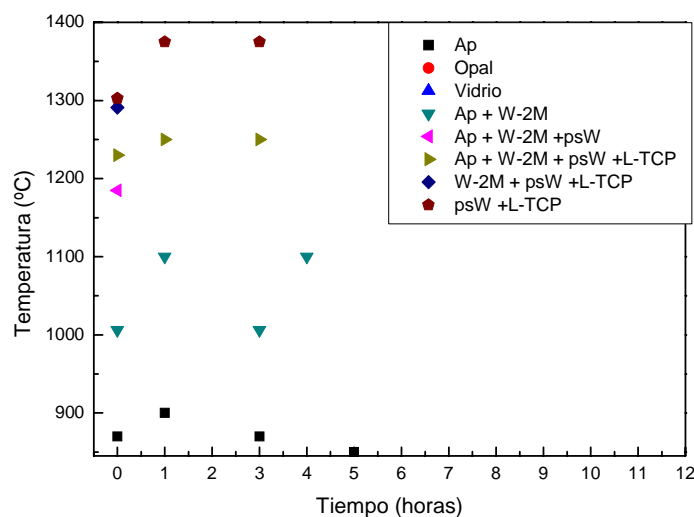


**Figura 6.16.** Micrografías y análisis DAS de la muestra tratada a  $800^\circ\text{C}$   $72\text{h}^{-1}$ , obtenidas por MET.

### VI.3.2. Estudios de la zona cristalina

Para estudiar la zona cristalina del sistema se han realizado diferentes tratamientos térmicos a temperaturas mayores a 870°C usando el mismo ciclo térmico utilizado para la determinación de la zona opal (véase figura 6.11).

Después de cada tratamiento térmico se determinaron mediante DRX las fases cristalinas presentes, en la figura 6.17 se resumen los resultados obtenidos. Es de notar que para temperaturas mayores a 1100°C las muestras presentan pequeñas grietas, las cuales aumentan de tamaño al aumentar la temperatura y/o el tiempo de permanencia (véase figura 6.18).



**Figura 6.17.** Diagrama Temperatura-Tiempo-Transformación (TTT) para el vidrio eutéctico del sistema W-TCP

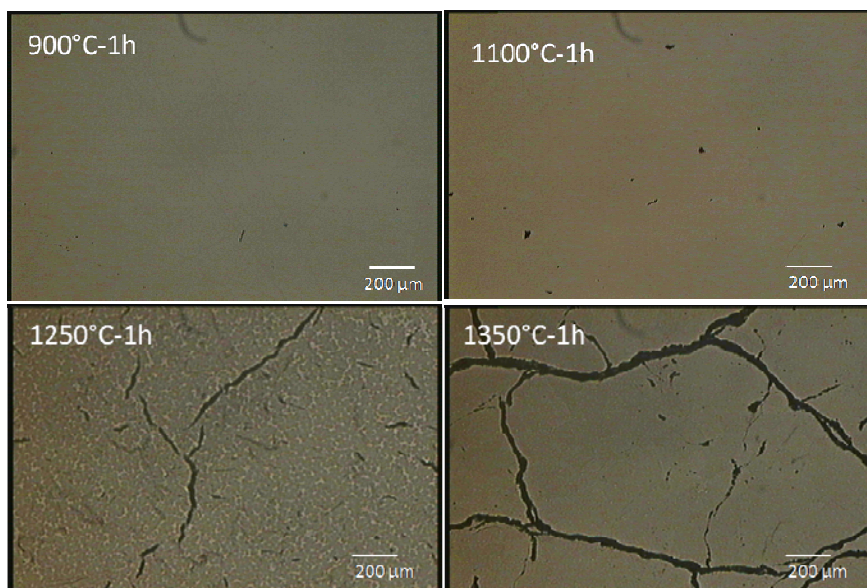
Por lo tanto, teniendo en cuenta los resultados obtenidos de este estudio con el ciclo térmico empleado y partiendo de una muestra en bloque, existen dos tipos de materiales que se pueden obtener sin grietas, los cuales presentan las siguientes fases:

*Material 1:* fase amorfa y Ap dCa.

*Material 2:* fase amorfa, Ap dCa y wollastonita 2M.

Aunque los materiales que contienen apatita son interesantes para aplicaciones ortopédicas y dentales, debido a su biocompatibilidad y su fuerte unión al hueso [23;24], en los últimos años se han realizado diferentes combinaciones de apatita y otra fase con el propósito de mejorar sus propiedades mecánicas [23-25]. Por lo tanto, es de mayor interés estudiar el

material 2, el cual contiene dos fases cristalinas apatita y wollastonita 2M, está última servirá para mejorar las propiedades mecánicas y además es una fase bioreabsorbible [26].

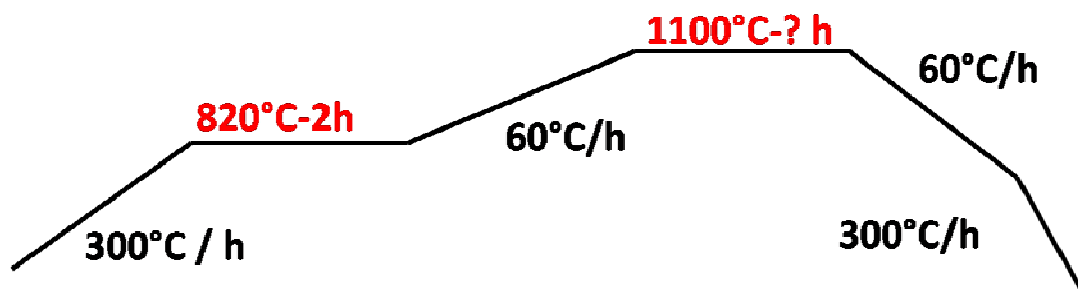


**Figura 6.18.** *Imágenes obtenidas por MOLR, para las muestras con diferentes tratamientos térmicos.*

Teniendo en cuenta lo antes expuesto se ha elegido la temperatura para obtener el material vitrocerámico a 1100°C.

Para establecer el ciclo térmico óptimo a 1100°C hay que determinar: a) el ciclo de calentamiento (con período de nucleación o no) b) el tiempo de permanencia y c) la velocidad de enfriamiento óptima.

Para establecer las primeras variables se han realizado dos tratamientos térmicos a 1100°C-1h, siguiendo el ciclo térmico de la figura 6.11 y el de la figura 6.19; la temperatura se estableció en base a la información suministrada por los datos de la figura 6.13. Después de cada tratamiento térmico las muestras fueron molidas y estudiadas mediante DRX-Rietveld.



**Figura 6.19.** Ciclo térmico propuesto para obtener un vitrocerámico conteniendo apatita y wollastonita-2M.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla VI.3, es posible observar que la muestra que ha sido sometida al ciclo térmico con nucleación a 820°C-2h, presenta un porcentaje menor de amorfo. Debido a que el ciclo térmico afecta los porcentajes de fases presentes en la muestra final, se seleccionó el ciclo térmico de la figura 6.19 para los posteriores estudios, ya que será el ciclo térmico a usar para obtener las piezas de vitrocerámico para los diferentes ensayos de caracterización (mecánico, biológico, etc).

Posteriormente, usando el ciclo térmico escogido (figura 6.19) se realizaron tratamientos a 1100°C durante diferentes períodos de tiempo (desde 6min a 5 horas), para determinar el tiempo de permanencia a esta temperatura.

**Tabla VI.3.**

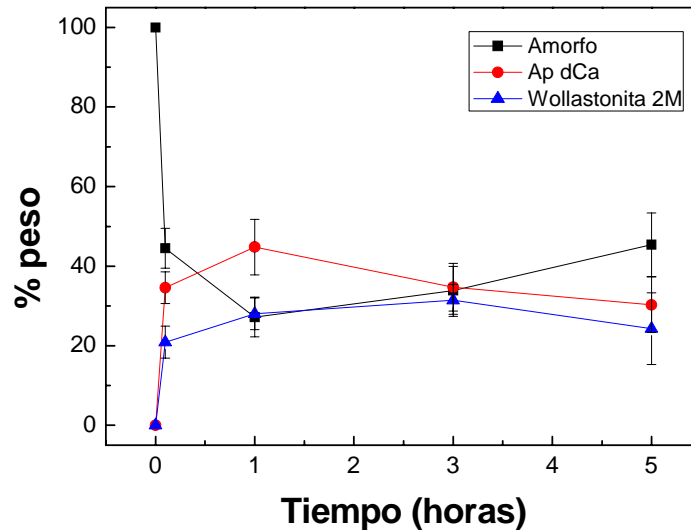
*Resultados del refinamiento Rietveld para las muestras con tratamientos térmico sin nucleación y con nucleación.*

Fases	Tratamiento térmico (1100°C-1h)	
	Ciclo <b>sin</b> nucleación. <b>Figura 6.11</b>	Ciclo <b>con</b> nucleación. <b>Figura 6.19</b>
<b>Amorfa</b>	34,6 (5)	27,2 (3)
<b>Ap dCa</b>	41,2 (6)	44,8 (7)
<b>Wollastonita-2M</b>	24,2 (4)	28,0 (3)

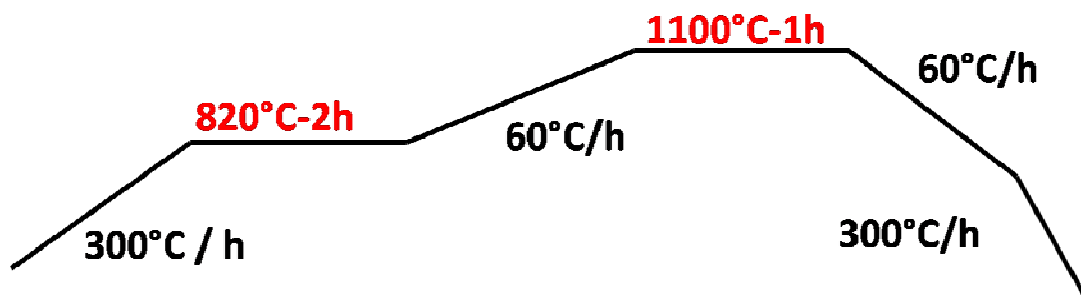
Los resultados obtenidos mediante DRX-Rietveld se muestran en la figura 6.20, en ella es posible observar que para 6 min de tratamiento térmico se reduce en un 56 % la cantidad de amorfo y para 1 h un 78 %. Por otro lado, al aumentar el tiempo de tratamiento a 3 y 5

horas no se observa una variación significativa en lo referente a la cantidad de amorfo, teniendo en cuenta la precisión del método usado.

Con todos los resultados obtenidos se ha establecido el ciclo térmico óptimo para obtener el vitrocerámico de Apatita-Wollastonita-2M, el cual se presenta en la figura 6.21.



**Figura 6.20.** Porcentaje en peso de fases presentes en la muestra después del tratamiento térmico a 1100°C durante diferentes tiempos. Datos obtenidos mediante refinamiento Rietveld.



**Figura 6.21.** Ciclo térmico establecido para obtener el vitrocerámico compuesto por apatita-wollastonita-2M.



### VI.3.3.Discusión

El estudio de la zona opal indica que al aumentar el tiempo de permanencia disminuye la temperatura a la que aparece la fase Ap dCa. Así se tiene que en el estudio no-isotérmico, sección anterior, la fase Ap dCa aparecía a  $\sim 870^{\circ}\text{C}$ , al someter la muestra a un tratamiento térmico de 1 h, la fase Ap dCa comienza a cristalizar a  $\sim 830^{\circ}\text{C}$ , disminuyendo la temperatura de aparición de esta fase.

Al aumentar el tiempo a 3 horas, la temperatura de aparición de la Ap dCa disminuye hasta  $\sim 810^{\circ}\text{C}$ , pero para disminuir la temperatura más allá de este valor, son necesarios largos tiempos de permanencia, llegándose alcanzar 72 horas para nuclear a  $800^{\circ}\text{C}$ .

Se ha confirmado, mediante DRX y MET-DAS, que la zona opal corresponde a las muestras que presentan un difractograma de rayos X amorfo y pérdida de la transparencia, pero el estudio de estas muestras por MET indica la presencia de núcleos de fases cristalinas, que debido a su tamaño nanométrico y pequeña cantidad, no pueden ser detectados mediante DRX.

Los resultados del estudio de la zona cristalina indican que a diferencia de la zona opal, para disminuir la temperatura de aparición y/o transformación de las fases hacen falta tiempos de permanencia muy altos, con los usados en el presente trabajo (5 horas) no ha sido posible disminuir la temperatura de formación de las distintas fases cristalinas establecida en los estudios no-isotérmicos.

La aparición de grietas en las muestras tratadas a temperaturas mayores de  $1100^{\circ}\text{C}$  se puede atribuir a:

- la transformación de fase de la wollastonita y/o la apatita ( $\text{W-2M} \rightarrow \text{pW}$ ;  $\text{Ap} \rightarrow \alpha\text{-TCP}$ ) - diferencias en los coeficientes de dilatación entre el amorfo y las fases cristalinas.
- el carácter anisótropo de la expansión térmica del  $\alpha$ -fosfato tricálcico y la wollastonita que puede producir importantes microtensiones durante el enfriamiento.
- los cambios de densidad consecuencia de las diferencias de densidad entre el vidrio y las distintas fases cristalinas.

Todos estos cambios producen una dilatación en el vidrio, como se observa en los resultados obtenidos mediante microscopía de calefacción (véase figura 5.13). Además al aumentar la temperatura disminuye el contenido en fase amorfa presente, que absorbe los

esfuerzos generados por las diferencias entre los coeficientes de dilatación de las diferentes fases cristalinas presentes.

Se ha determinado que la muestra obtenida a 1100°C-1h con un ciclo térmico con nucleación presenta mayor porcentaje de fase cristalina, si se compara con la muestra que no lo tiene. Esto indica que durante la etapa de nucleación al aumentar el número de núcleos aumenta la cristalinidad de la muestra.

## **VI.4.Conclusiones**

En este capítulo, se presentó el proceso de desvitrificación y cristalización del vidrio eutéctico del sistema wollastonita-fosfato tricálcico mediante DN. El estudio realizado demuestra que la DN combinada con otras técnicas tales como ATD, DRX-Rietveld y MEB-EC-EDS ha permitido determinar el mecanismo de desvitrificación no isotérmico del vidrio eutéctico. Este estudio corresponde a la primera etapa para el desarrollo de implantes de composición eutéctica dentro del sistema W-TCP, con mejores propiedades bioactivas y mecánicas.

Los resultados de esta sección han demostrado que el proceso de desvitrificación no-isotérmico del vidrio ocurre en etapas sucesivas:

- (1) Nucleación y crecimiento en el vidrio en masa de la fase apatita deficiente en calcio, esta fase ha sido detectada desde ~870°C. Inicia su descomposición a ~1291°C.
- (2) La segunda fase que cristaliza es la wollastonita-2M, a ~1006°C, esta fase de baja temperatura desaparece totalmente a ~1303°C.
- (3) A ~1185°C se detecta la fase pseudowollastonita que continúa creciendo hasta ~1375°C.
- (4) Durante el proceso de desvitrificación y en condiciones de no equilibrio la wollastonita-2M y la pseudowollastonita coexisten entre ~1185 y ~1303°C.
- (5) La fase  $\alpha$ -TCP se detecta a ~1230°C y continúa creciendo hasta ~1375°C.

A 1375°C, el material presenta una microestructura de equilibrio formada por colonias cuasi-esféricas de ~50 $\mu$ m, conteniendo ps-W y  $\alpha$ -TCP, donde la primera fase es la continua

y la última se encuentra dentro de ésta. Esta microestructura corresponde a una estructura eutéctica irregular.

El análisis cuantitativo (incluyendo el porcentaje de fase amorfa) mediante la metodología Rietveld, es una técnica adecuada para la caracterización de la composición mineralógica de las vitrocerámicas.

Entre los diferentes materiales que se pueden conseguir al variar el tratamiento térmico, se decidió obtener un vitrocerámico con apatita y wollastonita 2M, ya que la primera es una fase biocompatible y presenta una fuerte unión al hueso, mientras que la segunda mejora las propiedades mecánicas del material y además es una fase reabsorbible.

## VI.4. Conclusions

In this chapter, a novel insight into the devitrification and crystallization of wollastonite-tricalcium phosphate eutectic glass using neutron diffractometry has been presented. This research has shown that neutron diffractometry under non-isothermal conditions combined with other techniques, such as DTA, XRD and FE-SEM / EDS, have allowed determining the devitrification and crystallization mechanism of the mentioned eutectic glass. This study is the first step to try to develop W-TCP implants with better bioactivity and improved mechanical properties by means of processing science.

The results show that devitrification process of the eutectic glass takes place in successive stages:

- (1) The first phase that nucleates and growth from the bulk glass is a Ca-deficient apatite. The apatite phase crystallization is detected from  $\sim 870^{\circ}\text{C}$ . This phase entirely decomposed at about  $\sim 1291^{\circ}\text{C}$ .
- (2) The second phase that begins to crystallize is wollastonite-2M that appears at  $\sim 1006^{\circ}\text{C}$ . This low temperature phase totally disappears at  $\sim 1303^{\circ}\text{C}$ .
- (3) At  $\sim 1185^{\circ}\text{C}$  crystalline pseudowollastonite is detected and remains growing up to  $1350^{\circ}\text{C}$ .
- (4) Wollastonite-2M and pseudowollastonite coexist in a non-equilibrium condition from  $\sim 1185$  to  $\sim 1303^{\circ}\text{C}$  during the devitrification process.

(5) At ~1230°C  $\alpha$ -TCP begins to crystallize and remains growing up to 1350°C.

At 1375°C the devitrified eutectic glass is comprised of quasi-rounded colonies formed by a homogeneous mixture of psW and  $\alpha$ -TCP crystals, where psW is the continuous interlocking phase and  $\alpha$ -TCP is evenly distributed within it. The microstructure of the material corresponds to an irregular eutectic structure.

The quantitative analysis (including the percentage of amorphous phase) by the Rietveld method is a suitable technique for the characterization of the mineralogical composition of the glass ceramic.

Among the different materials' compositions that can be produced by varying the heat treatment, it was possible to obtain a glass ceramic containing apatite and wollastonite-2M. This conclusion was based on the fact that the first phase, apatite, is biocompatible and has a strong chemical bonding, while the other phase, wollastonite-2M, could improve the mechanical properties of materials and also has resorbable properties.

## REFERENCIAS

- [1] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. Deaza, "Phase-Diagram of Wollastonite-Tricalcium Phosphate," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 78, no. 6, pp. 1653-1656, 1995.
- [2] H. X. Yang and C. T. Prewitt, "On the crystal structure of pseudowollastonite ( $\text{CaSiO}_3$ )," *American Mineralogist*, vol. 84, no. 5-6, pp. 929-932, 1999.
- [3] H. X. Yang and C. T. Prewitt, " $\text{Ca}_3(\text{SiO}_3)_3$  -pseudowollastonite,".
- [4] M. Mathew, L. W. Schroeder, B. Dickens, and W. E. Brown, " $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  -alpha-," 2009.
- [5] M. Mathew, L. W. Schroeder, B. Dickens, and W. E. Brown, "The crystal structure of alpha- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ," 33 ed 1977, pp. 1325-1333.
- [6] A. C. Larson and R. B. Von Dreele, "Los Alamos National Laboratory Report No. LA-UR-86-748," in *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos* 1994.
- [7] A. G. De La Torre, S. Bruque, and M. A. G. Aranda, "Rietveld quantitative amorphous content analysis," *Journal of Applied Crystallography*, vol. 34, pp. 196-202, 2001.
- [8] R. A. Young, *The Rietveld Method* Oxford University Press, 1993, p. 336.
- [9] "Program NOESYS, Version 1.2, Fortner Software LLC, Sterling, VA (USA).," 2009.
- [10] R. M. Wilson, J. C. Elliot, S. E. P. Dowker, and L. M. Rodriguez-Lorenzo, " $\text{Ca}_{9.92}(\text{P}_{5.85}\text{O}_{23.54})(\text{OH})_{2.03}(\text{H}_2\text{O})_{2.194}$ ," ICSD Collection Code: 152190 ed.
- [11] F. J. Trojer, " $\text{CaSiO}_3$  -Wollastonite 2M," ICSD Collection Code: 34908 ed 2009.
- [12] F. J. Trojer, "The crystal structure of parawollastonite," 127 ed 1968, pp. 291-308.
- [13] R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, and L. M. Rodriguez-Lorenzo, "Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite," *Biomaterials*, vol. 26, no. 11, pp. 1317-1327, 2005.
- [14] P. N. De Aza, A. H. De Aza, P. Pena, and S. De Aza, "Bioactive glasses and glass-ceramics," *Boletín de la Sociedad Española de Cerámica y Vidrio*, vol. 46, no. 2, pp. 45-55, 2007.
- [15] P. N. De Aza, F. Guitian, and S. De Aza, "Bioeutectic: a new ceramic material for human bone replacement," *Biomaterials*, vol. 18, no. 19, pp. 1285-1291, 1997.
- [16] A. H. De Aza, P. Velasquez, M. I. Alemany, P. Pena, and P. N. De Aza, "In situ bone-like apatite formation from a Bioeutectic((R)) ceramic in SBF dynamic flow," *Journal of the American Ceramic Society*, vol. 90, no. 4, pp. 1200-1207, 2007.
- [17] A. K. Varshneya, *Fundamentals of inorganic glasses*, 2da ed. UK,Sheffield: Society of Glass Technology, 2006, p. 682.
- [18] J. F. Navarro, *El vidrio*, 3 ed. Madrid, Spain: Consejo Superior de Investigaciones Científicas. SECV, 2003, p. 270.
- [19] W. Vogel, "Structure and crystallization of glasses," Leipzig,Germany: Pergamon Press, 1971, p. 246.

- [20] W. Vogel, "Chemistry of glass. Westerville, OH," The American Ceramic Society, 1985, p. 325.
- [21] N. I. Min'ko and V. V. Varavin, "Effect of water on the structure and properties of glass (review)," 64 ed 2007, pp. 71-74.
- [22] S. M. Salman, S. N. Salama, H. Darwish, and H. A. Abo-Mosallam, "In vitro bioactivity of glass-ceramics of the  $\text{CaMgSi}_2\text{O}_6\text{-CaSiO}_3\text{-Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F-Na}_2\text{SiO}_3$  system with  $\text{TiO}_2$  or  $\text{ZnO}$  additives," *Ceramics International*, vol. 35, no. 3, pp. 1083-1093, 2009.
- [23] R. Z. LeGeros and J. P. LeGeros, "Dense hydroxyapatite," in *An Introduction to Bioceramics: Advanced Series in Ceramics*. L. L. Hench and J. Wilson, Eds. Singapore: World Scientific, 1993, pp. 139-180.
- [24] Z. Strnad, "Recent progress in bioactive ceramics for medical application in Czech Republic," 999, pp. 2-8.
- [25] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Mechanical-Properties of A New Type of Apatite-Containing Glass Ceramic for Prosthetic Application," *Journal of Materials Science*, vol. 20, no. 6, pp. 2001-2004, 1985.
- [26] T. Kokubo, "Bioactive Glass-Ceramics - Properties and Applications," *Biomaterials*, vol. 12, no. 2, pp. 155-163, 1991.

## **CAPÍTULO VII**

### **OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE UN NANOMATERIAL VITROCERÁMICO CONTENIENDO APATITA Y WOLLASTONITA 2M**





## VII.OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FÍSICO-QUÍMICA DE UN NANOMATERIAL VITROCERÁMICO CONTENIENDO APATITA Y WOLLASTONITA 2M

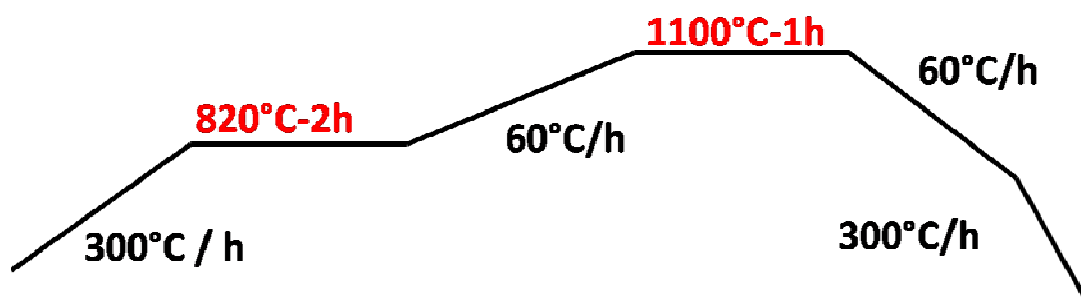
### VII.1.Introducción

Los huesos y dientes son materiales multifásicos; por lo tanto, sus propiedades pueden ser simuladas mediante un material multifásico. La cristalización de los vidrios se presenta como una buena opción para simular el tejido duro en aquellas aplicaciones donde las diferencias entre el módulo de elasticidad y la tenacidad del implante y del tejido receptor no sean un factor importante [1;2].

En el presente capítulo se describe la obtención de un vitrocerámico conteniendo apatita y wollastonita 2M. Además se van a presentar los resultados de su caracterización físico-química (composición química, caracterización microestructural y propiedades mecánicas).

### VII.2.Obtención del vitrocerámico

Como se ha establecido en el capítulo VI (sección VI.3.2) el tratamiento térmico para obtener el vitrocerámico consta de dos etapas una a 820°C durante 2 horas y otra a 1100 °C durante 1h. Luego se enfría lentamente ( $1^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) hasta la temperatura  $T_g$  del vidrio original (795 °C), y seguidamente se enfría a  $5^{\circ}\text{C h}^{-1}$  hasta temperatura ambiente.



**Figura 7.1.** Ciclo térmico para obtener las muestras de vitrocerámico. Este ciclo ha sido establecido en el capítulo VI.

### VII.3. Caracterización físico-química del vitrocerámico

Después de realizar el tratamiento térmico el vitrocerámico obtenido fue caracterizado desde un punto de vista físico-químico, aunque los estudios en SFA se pueden considerar parte de estos, son presentados en un capítulo aparte.

#### VII.3.1. Composición química

Al igual que se hizo con el vidrio en el capítulo V, se ha estudiado la composición química del vitrocerámico mediante FRX con el fin de determinar si se mantenía la composición eutéctica del sistema W-TCP. Muestras del vitrocerámico fueron molidas en un molino de WC hasta un tamaño de partícula  $< 63 \mu\text{m}$  y posteriormente analizadas, los resultados se muestran en la tabla VII.1. Es posible observar que el vitrocerámico mantiene la composición eutéctica de partida, siendo el MgO la mayor impureza (0,10 % en peso) como ha ocurrido para el vidrio (véase capítulo V).

**Tabla VII. 1.**

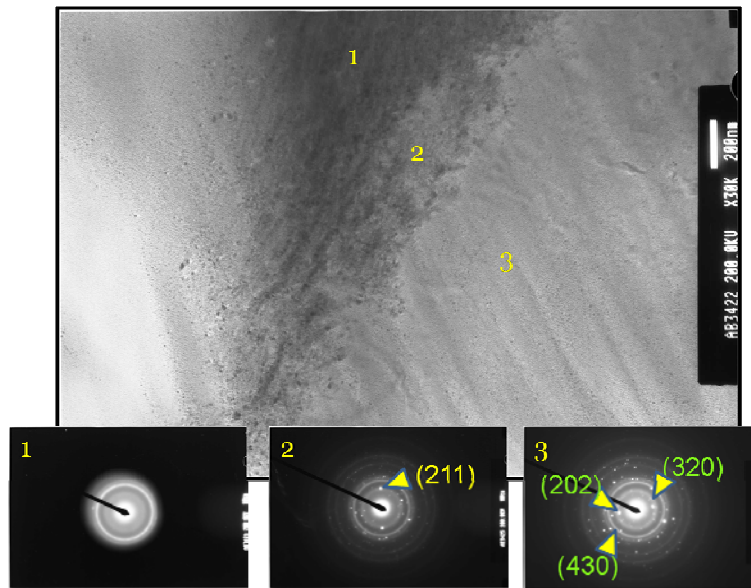
*Resultados de los análisis mediante fluorescencia de rayos X del vitrocerámico y composición teórica del punto eutéctico del sistema W-TCP. Valores mostrados en % en peso.*

W-TCP	CaO	SiO <sub>2</sub>	P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	MgO	Na <sub>2</sub> O	K <sub>2</sub> O	Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	MnO	TiO <sub>2</sub>
Experimental	50,7(1)	30,7(3)	18,5(2)	0,10(1)	0,054(2)	0,001(3)	0,036(3)	0,005(1)	0,012(3)
Teórico	50,7	31,0	18,3	--	--	--	--	--	--

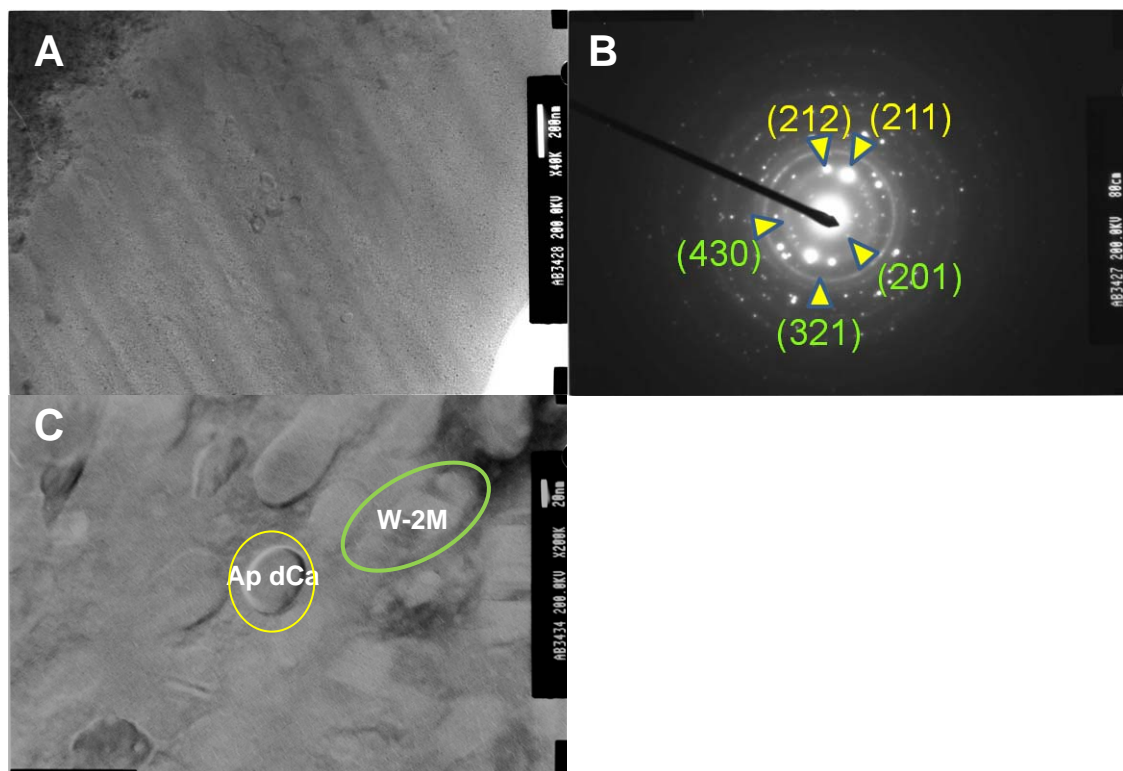
#### VII.3.2. Caracterización microestructural

La densidad aparente del vitrocerámico, determinada mediante el método de Arquímedes, fue de  $2,97 \text{ g cm}^{-3}$ .

La microestructura del vitrocerámico ha sido estudiada mediante MET-DAS-EDS y MEB-EC-EDS, para ello se prepararon adecuadamente muestras del vitrocerámico, véase capítulo III (sección III.2). Los resultados de los estudios microestructurales mediante MET-DAS se muestran en las figuras 7.2 y 7.3.



**Figura 7.2.** Micrografía y análisis DAS del vitrocerámico, obtenidas por MET. Zona 1: Fase amorfa, Zona 2: fase Ap dCa, Zona 3: compuesta principalmente por Wollastonita-2M.

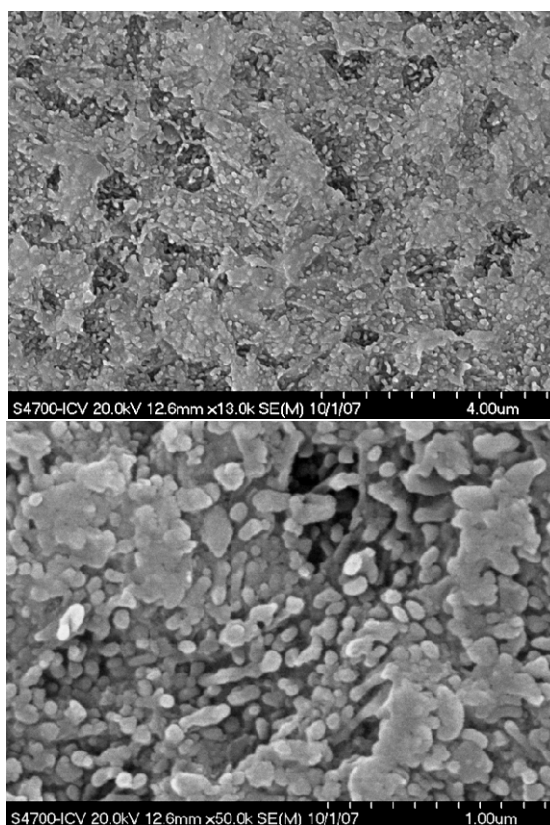


**Figura 7.3.** (A) Micrografía que muestra un detalle de la Zona 3 de la figura 7.2. (B) análisis MET-DAS. (C) Magnificación de la Zona 3, en la que se pueden observar cristales elipsoidales de Ap dCa y de wollastonita-2M, esta fase presenta maclas.

En la figura 7.2 es posible observar tres zonas diferentes, que mediante análisis DAS se ha determinado que están formadas principalmente por: una fase amorfa (Zona 1), Ap dCa (Zona 2) y wollastonita 2M (Zona 3). Esta última zona presenta un hábito fibroso, típico de la wollastonita 2M.

La Zona 3 se ha estudiado con más detalle, para ello se ha observado a mayores aumentos, los resultados se muestran en la figura 7.3A. Es posible observar que esta región está formada por nanocristales de Ap dCa y wollastonita-2M con una morfología elipsoidal, y un tamaño de cristalito entre 20 y 60 nm de largo y  $\sim 20$  nm de ancho (figura 7.3 B). Las partículas de wollastonita 2M presentan las maclas característicos de esta fase cristalina (figura 7.3 C) [3].

Para estudiar el vitrocerámico al MEB-EC-EDS ha sido necesario atacar la superficie del mismo con ácido acético al 5% v/v, los resultados se muestran en la figura 7.4.



**Figura 7.4.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vitrocerámico, en las que se observa una microestructura homogénea formada por agrupaciones o microdominios de nanocristales de Ap dCa, wollastonita-2M de  $\approx 2$   $\mu\text{m}$ .

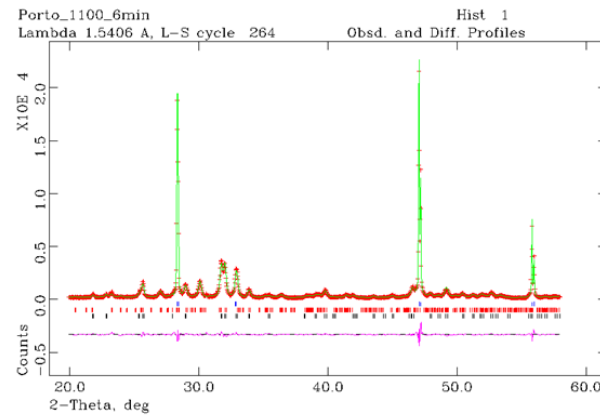
Las micrografías obtenidas por MEB-EC muestran que después del ataque químico la microestructura revelada está formada por dos niveles, uno micrométrico y otro submicrométrico. El primero se refiere a los dominios con un tamaño de 2  $\mu\text{m}$  formados por una fase residual interconectada (fase gris clara) y el segundo a los cristales de  $\sim 20\text{-}50$  nm de apatita (fase disuelta con el ataque químico) y wollastonita-2M que se encuentran dentro de los dominios.

La caracterización mineralógica del vitrocerámico se ha realizado mediante DRX y análisis Rietveld, parte de los resultados se han mostrado en el capítulo VI (sección VI.3.2, tabla VI.3 estudios no-isotérmicos). A modo de resumen, se presentan en la tabla VII.3 los porcentajes de fases determinados para el vitrocerámico. Además se muestran los parámetros de red de las fases cristalinas. En la figura 7.5 se puede observar la curva del ajuste Rietveld para el vitrocerámico, las estructuras cristalinas usadas han sido reportadas por R. M. Wilson como  $\text{Ca}_{9,303}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{0,606}1,97(\text{H}_2\text{O})$  [3;4], para la apatita y por F. Jr. Trojer como  $\text{Ca}(\text{SiO}_3)$  para la Wollastonita [5;6].

**Tabla VII.3.**

*Resultados del ajuste Rietveld: Porcentaje de fases presentes y parámetros de red de las fases cristalinas.*

	% peso	Parámetros de Red					
		a	b	c	alpha	beta	gamma
<b>Apatita</b>	44.8(7)	9.452(6)	9.452(6)	6.960(7)	90	90	120
<b>Wollastonita</b>	28.0(8)	15.428(4)	7.330(6)	7.051(9)	90	95.394	90
<b>Amorfo</b>	27.2(5)	----	----	----	----	----	----



**Figura 7.5.** Curva Rietveld ( $18-59^\circ/2\theta$ ) obtenida mediante el programa GSAS [7] para el análisis del vitrocerámico, se muestra el difractograma observado (cruces), calculado (línea) y la diferencia entre ambos (línea inferior). Las marcas presentes corresponden a los índices de Bragg de cada fase. Fichas ICSD usadas para identificar las fases: 152190= $\text{Ca}_{9,303}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{0,606}\text{I},97(\text{H}_2\text{O})$  (barras inferiores), 82707= $\text{CaF}_2$  y 34908= $\text{CaSiO}_3$  (barras superiores) [3-8].

Teniendo en cuenta que la cantidad y la composición de la fase amorfa residual varía con el tratamiento térmico, se ha calculado la composición de la misma a partir de los porcentajes en peso de las fases presentes, determinados en el análisis por Rietveld y la composición del vidrio original [9;10]. Por lo tanto, usando los resultados del análisis Rietveld se pueden establecer las ecuaciones que se presentan a continuación, a partir de las cuales se ha calculado la composición de la fase amorfa residual:

$$\text{CaO}_{\text{Vidrio}} = \text{CaO}_{\text{W-2M}} \bullet \% \text{Peso W-2M} + \text{CaO}_{\text{Amorfo}} \bullet \% \text{Peso Amorfo} + \text{CaO}_{\text{Ap dCa}} \bullet \% \text{Peso Ap dCa} \quad \text{Ec.VII.1.}$$

$$\text{SiO}_{2\text{Vidrio}} = \text{SiO}_{2\text{W-2M}} \bullet \% \text{Peso W-2M} + \text{SiO}_{2\text{Amorfo}} \bullet \% \text{Peso Amorfo} \quad \text{Ec.VII.2.}$$

$$\text{P}_2\text{O}_{5\text{Vidrio}} = \text{P}_2\text{O}_{5\text{Amorfo}} \bullet \% \text{Peso Amorfo} + \text{P}_2\text{O}_{5\text{Ap dCa}} \bullet \% \text{Peso Ap dCa} \quad \text{Ec.VII.3.}$$

Al realizar las simulaciones se determinó que la cantidad de fósforo presente en el vidrio original no es suficiente para que se forme el porcentaje de la fase Ap dCa que se ha obtenido mediante Rietveld, por lo tanto se ha propuesto una modificación de la Ec.VII.2, en la que se ha considerado que el silicio forma una solución sólida con la fase Ap dCa (Ec.VII.4), esto está de acuerdo con los valores obtenidos para los parámetros de red de las fases cristalinas.

$$\text{SiO}_{2\text{Vidrio}} = \text{SiO}_{2\text{W-2M}} \bullet \% \text{Peso W-2M} + \text{SiO}_{2\text{Amorfo}} \bullet \% \text{Peso Amorfo} + \text{SiO}_{2\text{Ap dCa}} \bullet \% \text{Peso Ap dCa} \quad \text{Ec.VII.4.}$$

Con las ecuaciones VII.1, VII.3 y VII.4, y considerando que han entrado 0,45 moles de  $\text{SiO}_2$  en la Ap dCa, se determinó que la fase amorfa del vitrocerámico desarrollado

presenta la siguiente composición en peso: CaO 43,5%, SiO<sub>2</sub> 55,9% y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,6%. El factor de Stevels para la fase amorfa, calculado siguiendo la ecuación V.1 (véase capítulo V), es de 2,34 siendo un 75% mayor que el del vidrio original (1,34).

### VII.3.3. Propiedades mecánicas

La caracterización mecánica del vitrocerámico se muestra en la tabla VII.4, con el fin de comparar los resultados obtenidos, también se muestran los valores para el Cerabone<sup>®</sup>, el hueso esponjoso y cortical[11;12].

**Tabla VII.4.**

*Propiedades mecánicas para el vitrocerámico desarrollado en la presente investigación y valores del Cerabone<sup>®</sup>, del hueso esponjoso y cortical[11;12].*

Material	E (GPa)	Hv (GPa)	K <sub>IC</sub> (MPa.m <sup>1/2</sup> )
Vitrocerámico Ap dCa-W2M	110±2	6,50±0,3	2,1 ± 0,5
Cerabone <sup>®</sup>	117	6,80	2
Hueso esponjo/cortical	4-16	-	-

### VII.4. Discusión

Los resultados de FRX indican que al igual que el vidrio, el vitrocerámico mantiene la composición eutéctica sin pérdida de elementos volátiles como el fósforo.

Como se ha determinado por MEB-EC, el material presenta una microestructura densa y homogénea, formada por una fase amorfa que encierra una mezcla de cristales de apatita y wollastonita-2M. Mediante MET-DAS se ha confirmado que esta nanoestructura está formada por nanopartículas de 20-60 nm de largo y ~20nm de ancho. La micro-nanoestructura del material mejora las propiedades mecánicas si se compara con el vidrio original, como se ha observado en los resultados de las propiedades mecánicas. Además la escala micro y nano que presenta el vitrocerámico es ventajosa para aplicaciones biomédicas, ya que actualmente se busca la obtención de biomateriales para la regeneración ósea con estructuras complejas, donde existan diferentes escalas de longitud jerárquicamente organizadas. En este sentido, la nanofase de Ap dCa presenta dimensiones similares a la fase inorgánica del hueso, como se puede observar en la tabla VII.5. Por otro lado, investigaciones han demostrado que la adhesión y la proliferación de células osteoblásticas aumentan en materiales cerámicos con nanofase/s [13], sin necesidad de usar

péptidos inmovilizadores (moléculas de adhesión). Por esta razón, cerámicos nanofásicos se presentan claramente como una clase promisoría única de materiales que aumentan la unión del implante ortopédico o dental al hueso yuxtapuesto, lo que mejora la eficacia global del implante [13].

**Tabla VII.5.**

*Dimensiones de los cristalitos presentes en el tejido duro (hueso), reportados en la bibliografía.*

Técnica de medida	Dimensiones de los cristales
MET	3-6 nm x 20 nm de largo [14]
DRX	10-35 nm de largo [15]
SAXS	50 nm x 25 nm x 1,5-4 nm [16;17]
SAXS y MET	30 nm x 20 nm x 1,5-2 nm [18]

La cuantificación de las nanofases presentes en el vitrocerámico, obtenidas del análisis Rietveld indica que las fases cristalinas (Ap dCa y wollastonita) representan un 72,8% en peso, siendo la apatita la fase mayoritaria. Los parámetros de red calculados para esta fase ( $a=b$  y  $c$ ) son ligeramente más altos que los reportados en la bibliografía para la hidroxiapatita estequiométrica y la Ap dCa (véase tabla VII.6). Esta pequeña diferencia en los parámetros de red puede ser explicada suponiendo que algunos fósforos (grupos  $\text{PO}_4^{3-}$ ) son reemplazados por silicio (grupos  $\text{SiO}_4^{4-}$ ) en la red de la Ap dCa, formando una silico Ap dCa ( $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_{5-y}(\text{SiO}_4)_y(\text{OH})_{1-y}\square_y$ , Si-Ap dCa). El radio iónico del  $\text{Si}^{4+}$  (0,42 Å) es mayor que el del  $\text{P}^{5+}$  (0,35 Å), lo que explica el incremento en los parámetros de red observado para la Si-Ap dCa [19;20].

Por otro lado, las simulaciones realizadas con las ecuaciones VII.1-VII.4 han indicado que para la cantidad de Ap dCa, obtenida mediante ajuste Rietveld del difractograma del vitrocerámico, debe existir silicio presente en la misma. Chang y col. [22] han encontrado que el vitrocerámico conteniendo fosfato tricálcico y wollastonita presenta silicio en la estructura cristalina del fosfato tricálcico. Igualmente, hay que indicar que todos estos cálculos son aproximados ya que las fórmulas usadas para la apatita siempre se han considerado estequiométricas, y en los vitrocerámicos tienden a cristalizar estructuras no estequiométricas como han establecido diferentes investigaciones [23;24].



**Tabla VII.6.**

*Parámetros de red de la hidroxiapatita pura y de la Ap dCa reportada en la literatura.*

	Parámetros de Red					
	a	b	c	alpha	beta	gamma
<b>Hidroxiapatita [21]</b>	9.413	9.413	6.875	90	90	120
<b>Apatita Deficiente en Calcio [3]</b>	9.440(1)	9.440(1)	6.879(2)	90	90	120

El parámetro de Stevels para la fase amorfa del vitrocerámico es mayor que el del vidrio original, ya que al cristalizar la fase Ap dCa hace que aumente el contenido de silicio en la fase amorfa. Este contenido de silicio no es alto ya que cristaliza la wollastonita 2M, empobreciendo así el amorfo en silicio y calcio. El valor del parámetro de Stevels para la fase amorfa indica que el vitrocerámico presenta posibilidades de ser bioactivo, ya que es menor de 3,16 [9]. Esto es importante, porque aunque el vidrio ha presentado alta bioactividad en SFA (véase capítulo V), el vitrocerámico obtenido mediante desvitrificación del mismo no necesariamente será bioactivo, como demuestran diferentes investigaciones [1;9]. Aunque es de notar que otra ventaja de la composición eutéctica del sistema W-TCP es que la composición inicial del vidrio tiene un contenido en silicio (31 % peso) menor que el de la fase cristalina wollastonita 2M (51,7 % peso) por lo que al cristalizar esta fase, el contenido de silicio disminuye en el amorfo.

Debido a que el parámetro de Stevels del amorfo del vitrocerámico es mayor que el del vidrio, se espera que en los estudios *in vitro* en SFA, el vitrocerámico presente una menor bioactividad que el vidrio original, pero hay que recordar que el vitrocerámico presenta unas propiedades mecánicas mejores que las del vidrio original.

## VII.5.Conclusiones

El vitrocerámico, obtenido mediante el tratamiento térmico establecido de los estudios de devitrificación, presenta las siguientes proporciones de fases: apatita deficiente en calcio (44,8 % peso), wollastonita 2M (28,0 % peso) y fase amorfa residual (27,2% peso).

De los estudios Rietveld y del análisis racional se ha encontrado que la fase apatita deficiente en calcio presenta pequeñas cantidades de  $\text{SiO}_2$  (0,45 moles) y que la fase amorfa presenta la siguiente composición en peso: CaO 43,5 %,  $\text{SiO}_2$  55,9 % y  $\text{P}_2\text{O}_5$  0,6%.

El parámetro de Stevels de la fase amorfa (2,34) indica que el vitrocerámico debe ser bioactivo.

Las propiedades mecánicas ( $E$ ,  $H_v$  y  $K_{IC}$ ) del vitrocerámico son mejores que las del vidrio original y cercanas a las del Cerabone<sup>®</sup>.

## VII.5.Conclusions

The glass-ceramic, obtained by thermal cycle established from the previous devitrification studies, was composed of 44.8 wt% Ca-deficient apatite, 28.0 wt% wollastonite-2M and 27.2 wt% of amorphous phase.

A combination of the Rietveld and rational analyses data; found that the calcium deficient apatite phase had a small amounts of  $\text{SiO}_2$  (0.45 mol) phase in solid solution, and that the amorphous phase was composed of CaO 43.5 wt.%,  $\text{SiO}_2$  55.9 wt.% and  $\text{P}_2\text{O}_5$  0.6 wt. %.

Stevels parameter of the amorphous phase (2.34) indicates that the ceramic should be bioactive.

The mechanical properties ( $E$ ,  $H_v$  and  $K_{IC}$ ) of the glass-ceramic were better than that of the original parent glass and comparable to Cerabone<sup>®</sup>.

## REFERENCIAS

- [1] A. J. Salinas, J. Roman, M. Vallet-Regi, J. M. Oliveira, R. N. Correia, and M. H. Fernandes, "In vitro bioactivity of glass and glass-ceramics of the 3CaO center dot P2O5-CaO center dot SiO2-CaO center dot MgO center dot 2SiO(2) system," *Biomaterials*, vol. 21, no. 3, pp. 251-257, 2000.
- [2] S. M. Salman, S. N. Salama, H. Darwish, and H. A. Abo-Mosallam, "In vitro bioactivity of glass-ceramics of the CaMgSi2O6-CaSiO3-Ca-5(PO4)(3)F-Na2SiO3 system with TiO2 or ZnO additives," *Ceramics International*, vol. 35, no. 3, pp. 1083-1093, 2009.
- [3] R. M. Wilson, J. C. Elliott, S. E. P. Dowker, and L. M. Rodriguez-Lorenzo, "Rietveld refinements and spectroscopic studies of the structure of Ca-deficient apatite," *Biomaterials*, vol. 26, no. 11, pp. 1317-1327, 2005.
- [4] R. M. Wilson, J. C. Elliot, S. E. P. Dowker, and L. M. Rodriguez-Lorenzo, "Ca<sub>9.92</sub>(P<sub>5.85</sub>O<sub>23.54</sub>)(OH)<sub>2.03</sub> (H<sub>2</sub>O)<sub>2.194</sub>," ICSD Collection Code: 152190 ed.
- [5] F. J. Trojer, "The crystal structure of parawollastonite," 127 ed 1968, pp. 291-308.
- [6] F. J. Trojer, "CaSiO<sub>3</sub> -Wollastonite 2M," ICSD Collection Code: 34908 ed 2009.
- [7] "Program NOESYS, Version 1.2, Fortner Software LLC, Sterling, VA (USA).," 2009.
- [8] A. C. Larson and R. B. Von Dreele, "Los Alamos National Laboratory Report No. LA-UR-86-748," in *Los Alamos National Laboratory, Los Alamos* 1994.
- [9] Z. Strnad, "Role of the Glass Phase in Bioactive Glass-Ceramics," *Biomaterials*, vol. 13, no. 5, pp. 317-321, 1992.
- [10] W. Höland and G. Beall, *Glass-ceramic technology*. Ohio, United States os American: The American Ceramic Society, 2002.
- [11] T. Kokubo, S. Ito, M. Shigematsu, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Mechanical-Properties of A New Type of Apatite-Containing Glass Ceramic for Prosthetic Application," *Journal of Materials Science*, vol. 20, no. 6, pp. 2001-2004, 1985.
- [12] P. N. De Aza, A. H. De Aza, P. Pena, and S. De Aza, "Bioactive glasses and glass-ceramics," *Boletin de la Sociedad Espanola de Ceramica y Vidrio*, vol. 46, no. 2, pp. 45-55, 2007.
- [13] T. J. Webster, C. Ergun, R. H. Doremus, R. W. Siegel, and R. Bizios, "Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics," *Biomaterials*, vol. 21, no. 17, pp. 1803-1810, 2000.
- [14] H. Fernandezmoran and A. Engstrom, "Electron Microscopy and X-Ray Diffraction of Bone," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 23, no. 2, pp. 260-264, 1957.
- [15] J. B. Finean and A. Engstrom, "Apatite Crystallites in Bone," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 23, no. 1, p. 202, 1957.
- [16] E. Wachtel and S. Weiner, "Small-Angle X-Ray-Scattering Study of Dispersed Crystals from Bone and Tendon," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 9, no. 10, pp. 1651-1655, 1994.

- [17] S. Weiner and P. A. Price, "Disaggregation of Bone Into Crystals," *Calcified Tissue International*, vol. 39, no. 6, pp. 365-375, 1986.
- [18] C. Burger, H. W. Zhou, H. Wang, I. Sics, B. S. Hsiao, B. Chu, L. Graham, and M. J. Glimcher, "Lateral packing of mineral crystals in bone collagen fibrils," *Biophysical Journal*, vol. 95, no. 4, pp. 1985-1992, 2008.
- [19] S. R. Kim, J. H. Lee, Y. T. Kim, D. H. Riu, S. J. Jung, Y. J. Lee, S. C. Chung, and Y. H. Kim, "Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors," *Biomaterials*, vol. 24, no. 8, pp. 1389-1398, 2003.
- [20] T. Tian, D. L. Jiang, J. X. Zhang, and Q. L. Lin, "Synthesis of Si-substituted hydroxyapatite by a wet mechanochemical method," *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 28, no. 1, pp. 57-63, 2008.
- [21] M. I. Kay, R. A. Young, and A. S. Posner, "Crystal Structure of Hydroxyapatite," *Nature*, vol. 204, no. 496, p. 1050-&, 1964.

## **CAPÍTULO VIII**

### **ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DEL NANOMATERIAL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE ESTUDIOS IN VITRO EN SUERO FISIOLÓGICO ARTIFICIAL**



## **VIII. ESTUDIO DE LA BIOACTIVIDAD DEL NANOMATERIAL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE ESTUDIOS IN VITRO EN SUERO FISIOLÓGICO ARTIFICIAL**

### **VIII.1.Introducción**

En este capítulo se estudia la bioactividad en Suero Fisiológico Artificial (SFA) del vitrocerámico desarrollado en el capítulo VII. Para ello se ha sumergido el material durante diferentes períodos de tiempo en SFA a 36,5 °C y se han estudiado los cambios que ocurren en la superficie del vitrocerámico, mediante MEB-EC-EDS y MET-EDS. Igualmente se han registrado los cambios de la concentración iónica y del pH del SFA durante el período de estudio.

### **VIII.2.Condiciones de Estudio**

Los estudios *in vitro* en SFA se han realizado mediante el procedimiento establecido en el capítulo III (sección III.7.).

Después de obtener el vidrio, se cortó mediante una microcortadora con disco de diamante obteniendo muestras prismáticas rectangulares, y se realizó el tratamiento térmico establecido en el capítulo VII (figura 7.1). Las muestras finales de vitrocerámico conteniendo apatita y wollastonita-2M presentaron unas dimensiones de  $\sim 1,6 \times 5,7 \times 8,6 \text{ mm}^3$ .

Las muestras de vitrocerámico se colocaron en un soporte de plástico y luego en un recipiente de plástico conteniendo 15 ml de SFA, calculado mediante la ecuación III.16. (véase capítulo III, sección III.7.)

Las muestras se sumergieron en SFA y se mantuvieron en una incubadora a 36,5 °C durante diferentes períodos de tiempo (3, 7, 14 y 21 días).

Los cambios en la concentración de los iones Ca, Si y P en la solución de SFA se han establecido mediante ICP-OES, mientras que los cambios en el pH de la solución han sido registrados mediante un transistor de efecto de campo Hanna-HI4212 (Bedfordshire, UK).

Después de los experimentos *in vitro* en SFA, la microestructura de la superficie y de las secciones transversales de las muestras se estudiaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi-S4700 (Tokio, Japón) dotado con un equipo de microanálisis por dispersión de energías (EDS).

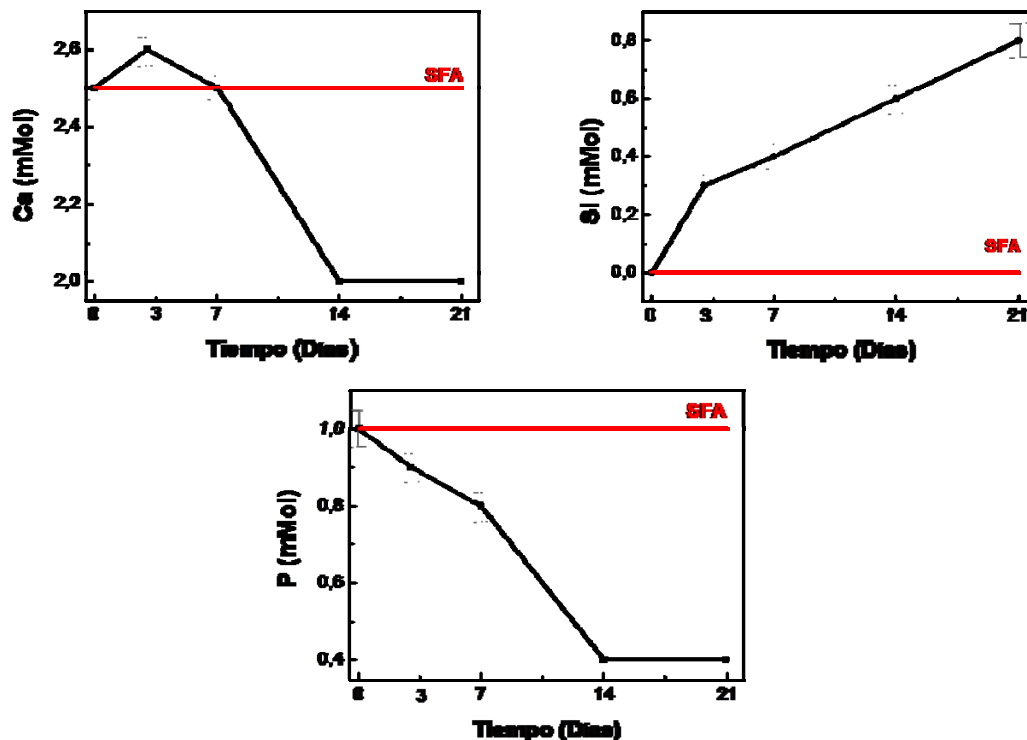
Con el objetivo de estudiar con más detalle los cambios ocurridos en la superficie del vitrocerámico en contacto con el SFA, después de los diferentes tiempos de estudio, se removió el producto formado sobre su superficie con una cuchilla de acero inoxidable. El polvo retirado se colocó en un mortero de ágata y se dispersó en alcohol etílico. Una gota de la suspensión se colocó sobre una rejilla de cobre, cubierta con grafito, para su caracterización por MET-EDS (MET, Jeol Jem 2010 a 200KeV)..

### **VIII.3.Resultados**

#### **VIII.3.1.Análisis de la concentración de iones en el SFA**

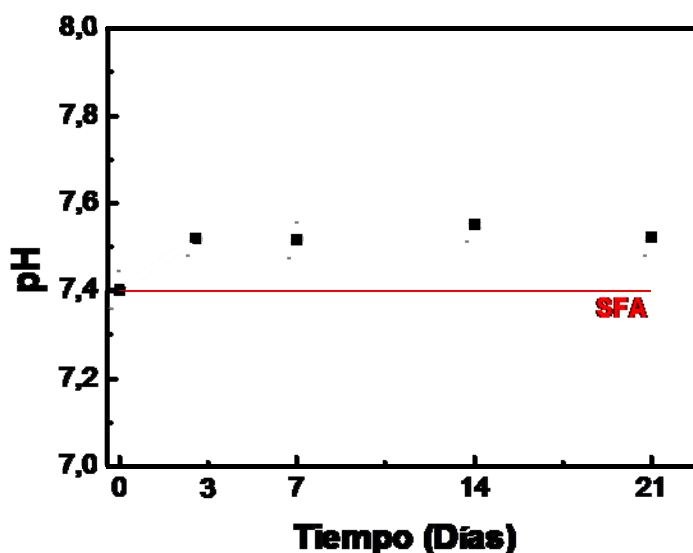
Las variaciones de concentración de los iones calcio, silicio y fósforo en el SFA a 36,5°C, después de sumergir las muestras de vitrocerámico durante 3, 7, 14 y 21 días, determinadas por ICP-AES se muestran en la figura 8. 1. Para comparar se ha representado la concentración inicial del SFA.





**Figura 8.1.** Relación de la concentración iónica del calcio (Ca), fósforo (P) y silicio (Si) en el SFA con respecto al tiempo de inmersión del vitrocerámico. La línea roja representa el valor al inicio del estudio.

El pH del SFA aumenta desde  $7,40 \pm 0,02$  a  $7,50 \pm 0,05$  después de 3 días de exposición de la muestra al SFA, desde este momento el pH permanece constante (véase figura 8. 2).



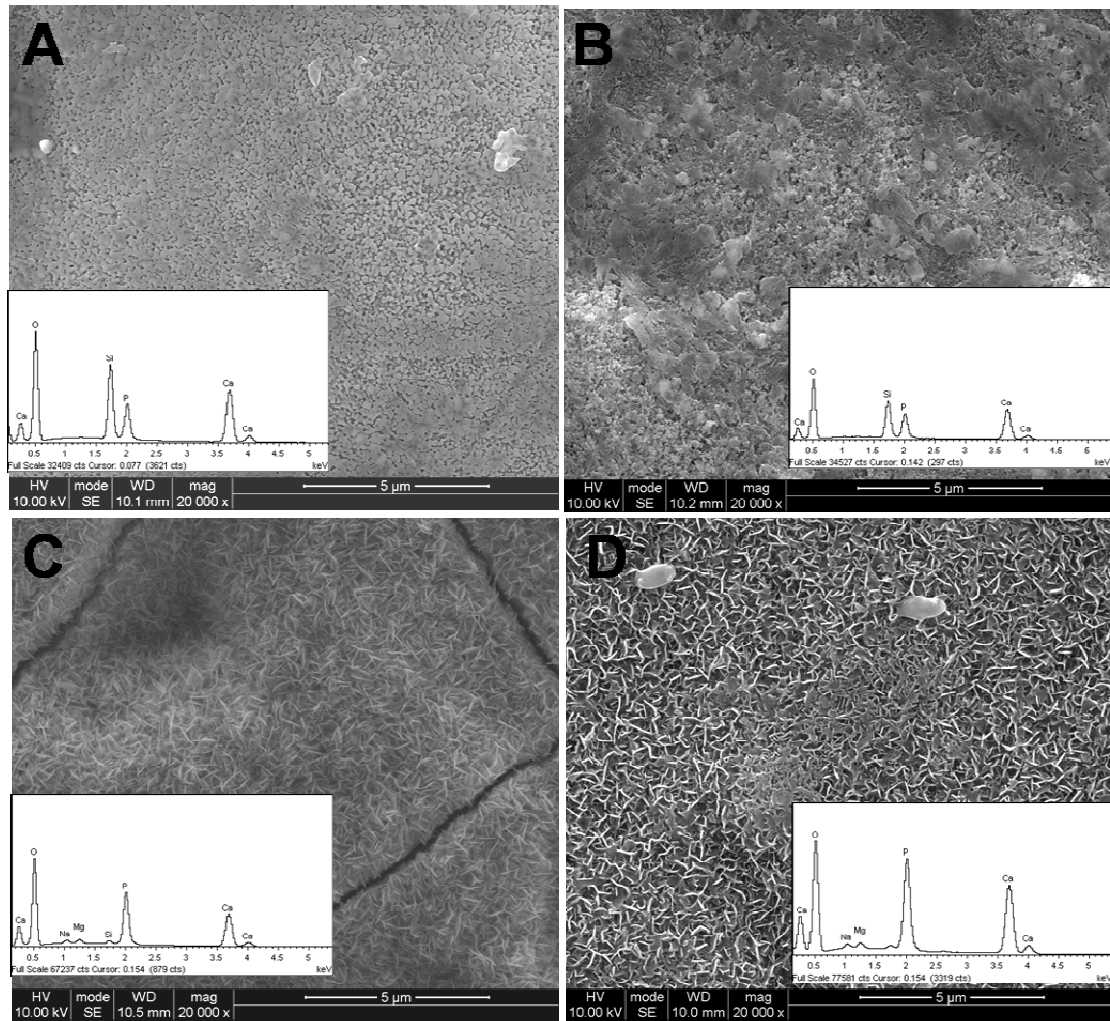
**Figura 8. 2.** Variación del pH del SFA con el tiempo de inmersión del vitrocerámico. La línea roja muestra el valor inicial.

### VIII.3.2. Estudio de la superficie del vitrocerámico

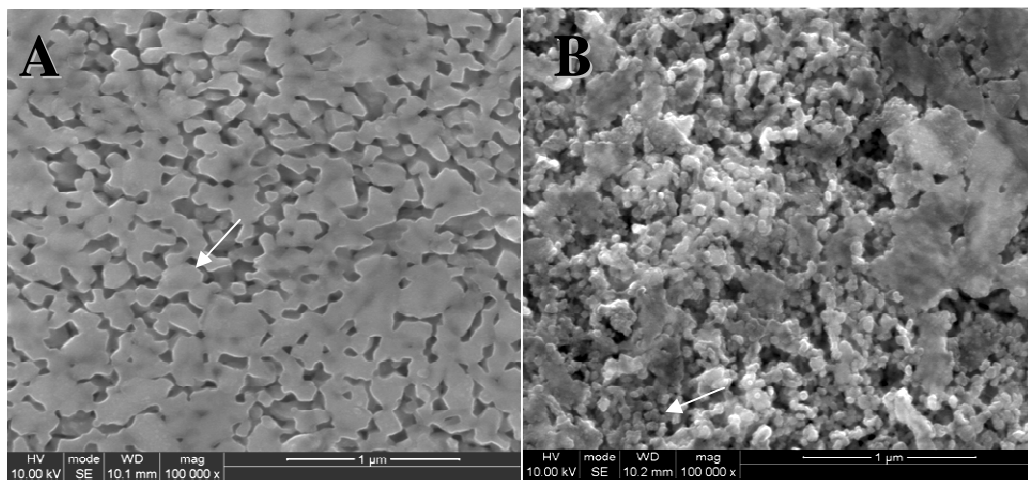
En las figuras 8. 3, 8. 4 y 8. 5 se muestran los resultados del estudio de la superficie del vitrocerámico en contacto con el SFA obtenidos por MEB-EC-EDS para muestras con diferentes tiempos de inmersión en SBF.

Después de 3 días de estudio se observa una disolución selectiva (figuras 8.3A y 8.4A), principalmente de la fase amorfa interconectada que se encuentra en los bordes de grano del vitrocerámico. Después de 7 días de estudio se observa la formación de una capa discontinua porosa formada por cristales nanométricos de apatita (véase figuras 8.3B y 8.4B).

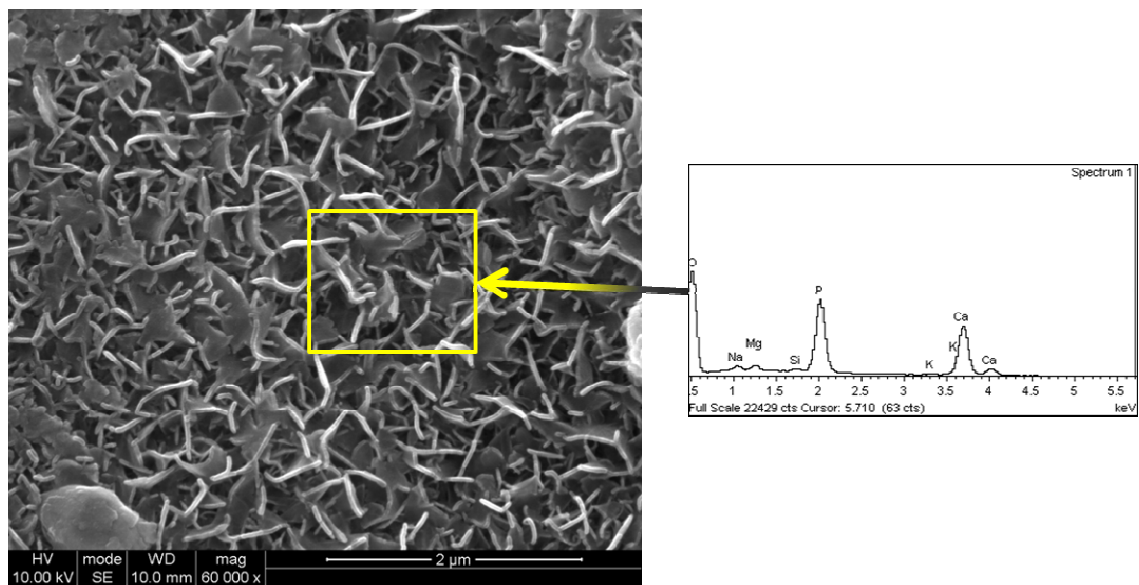
Después de 14 y 21 días de exposición al SFA se puede observar una capa continua cubriendo la superficie del vitrocerámico, figuras 8.3C y 8.3D. Esta capa está compuesta por cristales pseudo hexagonales con la morfología típica de apatita, con un tamaño de grano que aumenta con el tiempo de inmersión. La figura 8.5 muestra el microanálisis de esta capa después de 21 días de estudio, obtenido mediante MEB-EC-EDS, en el que es posible observar que la misma contiene principalmente Ca, P y una cantidad menor de Si, con una relación  $\text{Ca/P} \approx 1,66 \pm 0,03$ . En el espectro de EDS también se han detectado trazas de Mg y Na, elementos que provienen del SFA.



**Figura 8.3.** Micrografías y microanálisis obtenidos mediante MEB-EC-EDS de la superficie del vitrocerámico después de expuesto al SFA durante diferentes períodos de tiempo. (A) 3 días, (B) 7 días, (C) 14 días, (D) 21 días.

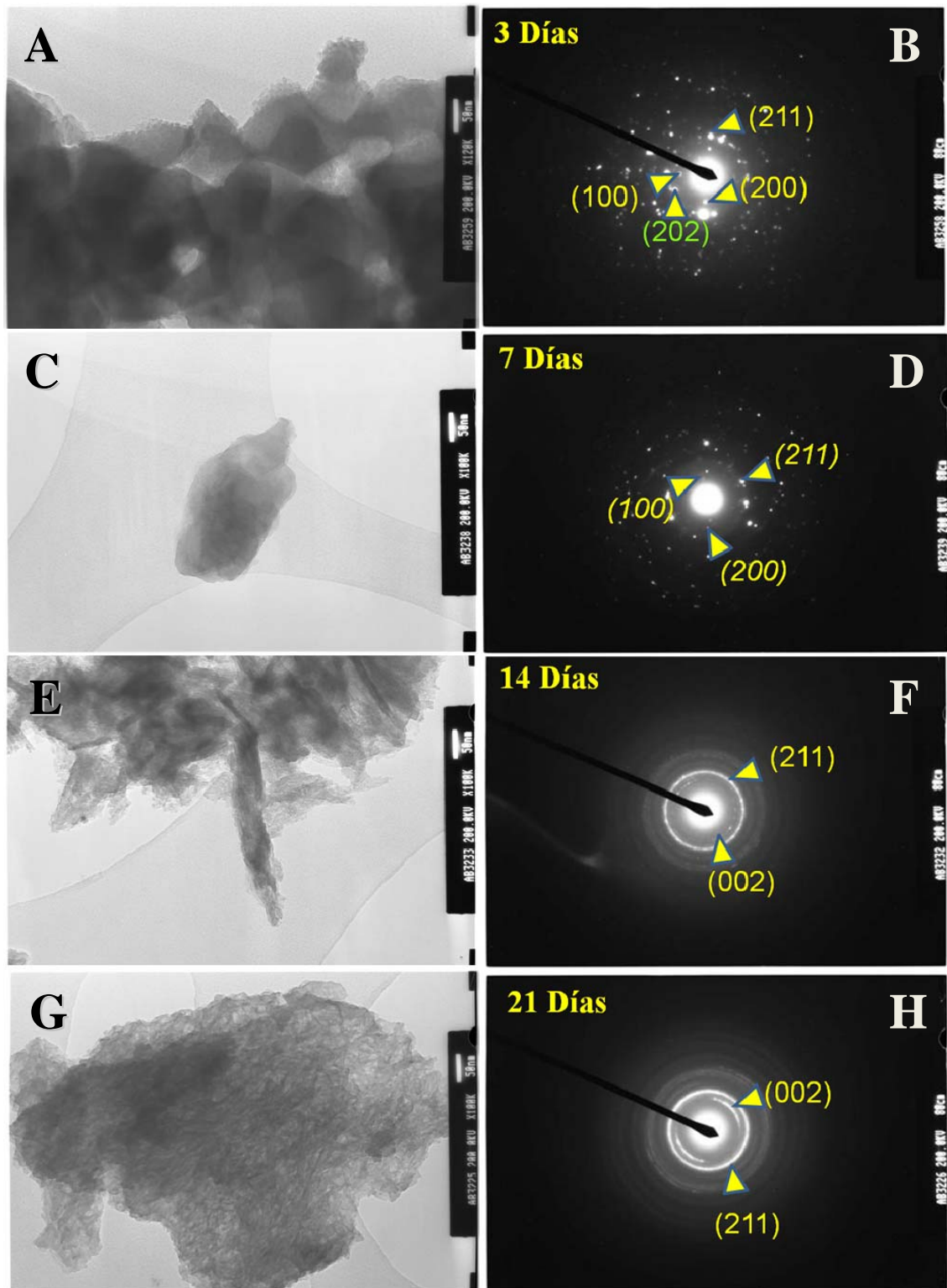


**Figura 8.4.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vitrocerámico después de 3 y 7 días en SFA. Detalle a mayores aumentos de las figuras (A) 8.3 A, 14 días y (B) 8.3 B, 21 días.



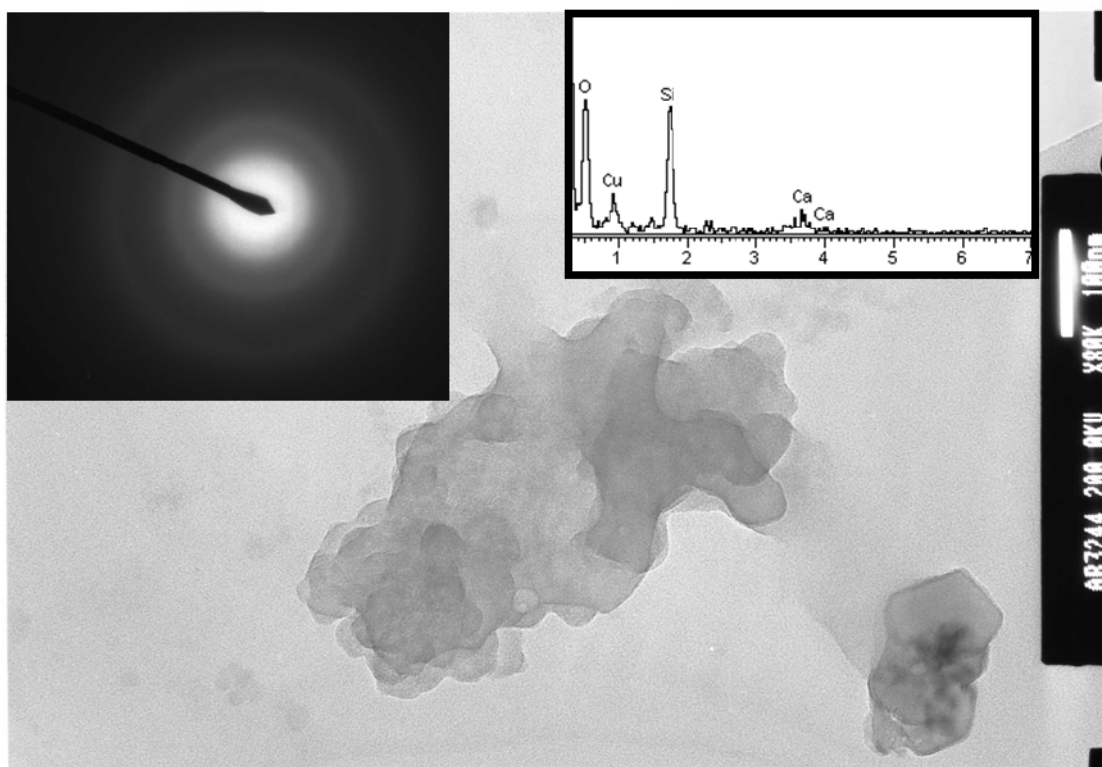
**Figura 8.5.** Micrografía y microanálisis obtenidos mediante MEB-EC-EDS del vitrocerámico después de 21 días de estudio. Detalle a mayores aumentos de la figura 8.3D.

La técnica de MET ha sido usada para examinar la ultraestructura del producto de la superficie formado después de exponer el vitrocerámico al SFA. Los resultados muestran la presencia de nanocristales, figura 8.6. Usando esta técnica también se ha logrado identificar, para la muestra de 7 días, la presencia de sílice amorfa (véase figura 8. 7).



**Figura 8.6.** Micrografías y análisis DAS obtenidos mediante MET del producto formado en la superficie del vitrocerámico inmerso en SFA durante diferentes tiempos. (A-B) 3 días, (C-D) 7 días, (E-F) 14 días y (G-H) 21 días.



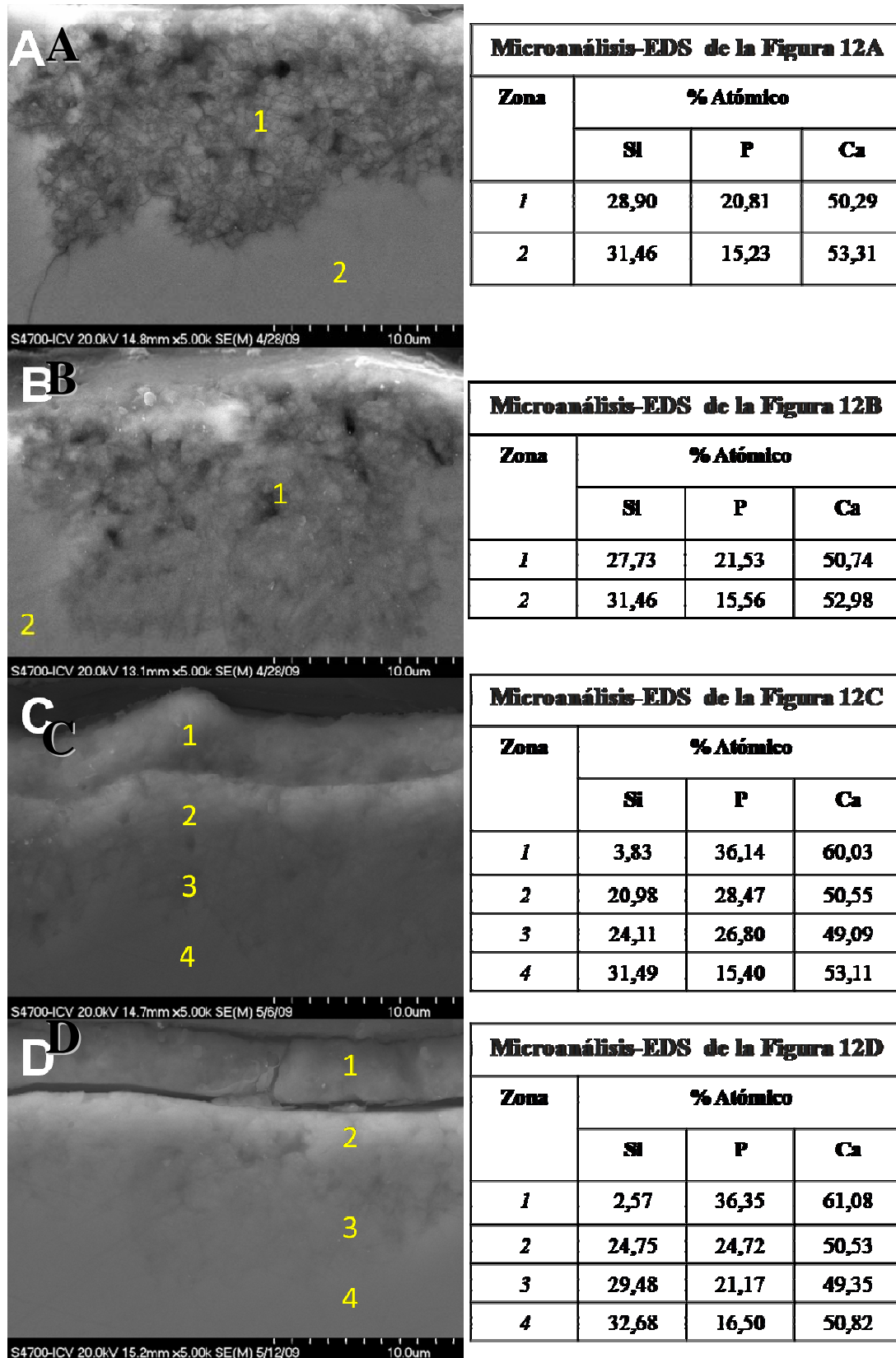


**Figura 8.7.** Micrografía, microanálisis y análisis DAS del producto formado sobre la superficie del vitrocerámico después de 7 días de inmersión en SFA.

### VIII.3.3. Estudio de la sección transversal del vitrocerámico

Las micrografías y microanálisis obtenidos por MEB-EC-EDS para las secciones transversales del vitrocerámico después de su inmersión en SFA durante 3, 7, 14 y 21 días a 36,5 °C, muestran la microestructura y composición de la interfaz vitrocerámico/SFA (véase figura 8.8).

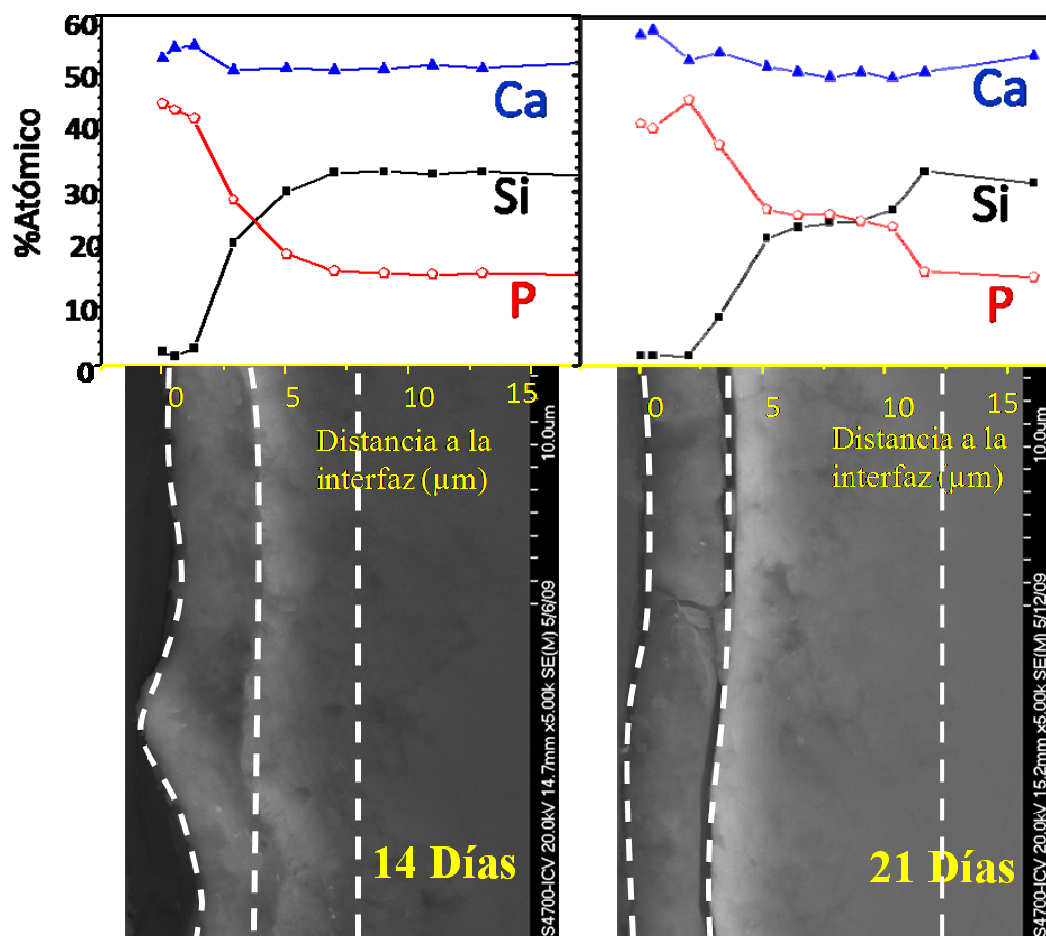
Las figuras 8.8A y 8.8B muestran la formación, después de 3 y 7 días de inmersión, de una zona paralela a la interfaz de reacción con el SFA. La zona 1 de la figura 8.8 corresponde a una capa porosa con un espesor de  $\sim 10 \mu\text{m}$ , formada después de 3 días de estudio. Esta capa con una composición promedio: 28,90 at% Si, 20,81 at% P, 50,29 at% Ca, contiene cantidades menores de Ca y Si que para el vidrio original (30,76 at% Si, 15,39 at% P, 53,85 at% Ca). Un comportamiento similar se ha observado en la muestra de 7 días (véase figura 8.8B), aunque la Zona 1 presenta un mayor espesor ( $\sim 15 \mu\text{m}$ ).



**Figura 8. 8.** Micrografías y microanálisis obtenidos por MEB-EC-EDS para las secciones transversales del vitrocerámico después de expuesto al SFA durante (A) 3 días, (B) 7 días, (C) 14 días y (D) 21 días.

La sección transversal de las muestras en contacto con el SFA durante 14 y 21 días, presenta una microestructura con dos zonas bien definidas en la interfaz con el SFA (véase figuras 8.8C y 8.8D). Se ha observado la formación masiva de una capa de carbohidroxiapatita (CHA), en la interfaz vitrocerámico/SFA, con una relación Ca/P entre 1,66 y 1,68. Paralela a la interfaz y adyacente a la capa de CHA se observa una zona con estructura porosa, con una composición de 20,98 at% Si, 28,47 at% P, 50,55 at% Ca, que se ha formado por disolución de la wollastonita-2M y la fase amorfa.

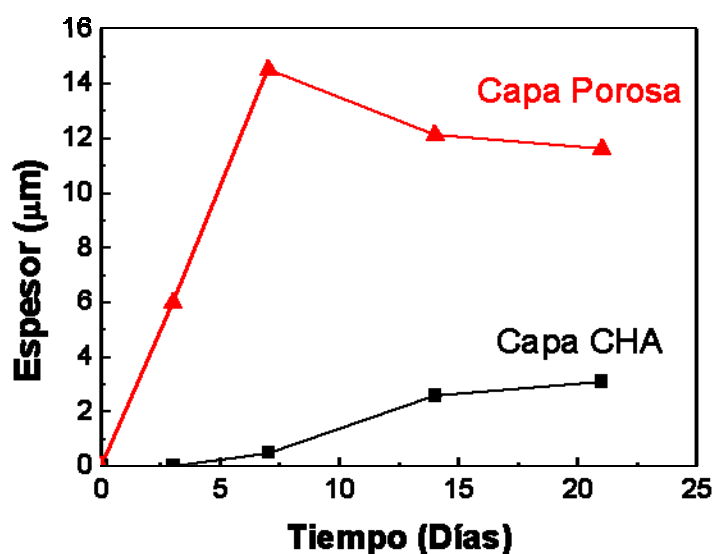
Para las muestras de 14 y 21 días se han realizado microanálisis por MEB-EC-EDS en diferentes zonas de la interfaz con el SFA, los resultados obtenidos se representan en la figura 8.9. Los resultados confirman el estudio realizado por MEB-EC, figuras 8. 8 C y D, en el que se han detectado la formación de diferentes capas de reacción paralelas a la interfaz con el SFA. En los microanálisis de MEB-EC-EDS se han observado cambios significativos en la concentración de Si y P a lo largo de la interfaz vitrocerámico/SFA.



**Figura 8.9.** Micrografías y microanálisis obtenidas por MEB-EC-EDS para la sección transversal de la muestra expuesta a SFA durante 14 días y 21 días.



Con los resultados obtenidos en el estudio de las secciones transversales de las distintas muestras estudiadas, se ha representado la evolución de las diferentes capas o zonas observadas, estas son: a) una capa de CHA y b) una capa porosa formada por la disolución de la wollastonita-2M y la fase amorfa (véase figura 8.10). Se ha encontrado que el grosor de la zona porosa aumenta hasta 15  $\mu\text{m}$  durante los primeros 7 días de estudio, mientras que la capa de CHA alcanza  $\approx 4 \mu\text{m}$  de grosor después de 21 días.



**Figura 8.10.** Evolución del grosor de la capa porosa (conteniendo apatita del vitrocerámico original) con el tiempo de inmersión en SFA. También se muestra el espesor de la capa de CHA formada sobre la superficie.

#### VIII.4.Discusión

Los cambios registrados en la concentración de los diferentes iones del SFA, figura 8.1, muestran que durante los primeros estadios del experimento, el vitrocerámico libera iones Si y Ca. Por otro lado, la concentración de Si aumenta continuamente durante todo el período de estudio *in vitro*, hasta alcanzar un valor de  $0,79 \pm 0,03 \text{ mMol}$  después de 3 semanas de estudio.

El comportamiento descrito anteriormente indica que la fase o fases que se disuelven contienen altas cantidades de silicio, por esta razón pueden ser la fase amorfa, que en el capítulo VII se ha observado que contiene altas cantidades de silicio, y la wollastonita-2M.

La degradación de ambas fases lleva a la formación de una capa de reacción de  $\text{Ap dCa}$  y poros, reemplazando así el vitrocerámico original en la superficie (véase figuras 8. 3A-B, 8. 4A-B y 8.8A-B). La segunda etapa que se presenta en el estudio de SFA, se encuentra entre 1 y 2 semanas, la concentración de iones calcio en el SFA disminuye hasta  $2,00 \pm 0,05$  mMol debido a la precipitación y formación de una capa de CHA sobre la superficie del vitrocerámico, después de este tiempo el contenido de Ca se mantiene constante (véase figuras 8.1, 8.3C-D, 8.5 y 8.8C-D). Por otro lado, la concentración de fósforo también decrece hasta  $0,40 \pm 0,05$  mMol en el curso de las dos primeras semanas, y después se mantiene constante. Esta disminución ha sido más prominente entre 1 y 2 semanas de exposición al SFA debido a la formación de la capa de CHA. Durante las primeras etapas de reacción, la alta concentración de Ca en la solución de SFA, figura 8.1, favorece la nucleación sobre la superficie de la muestra de una apatita con relación Ca/P alta ( $1,5 \leq \text{Ca/P} \leq 1,67$  mediante MEB-EC-EDS). Los microanálisis mediante EDS, de la figuras 8.3A-D y 8.5, facilitan datos para calcular la relación Ca/P de la CHA como una función del tiempo de inmersión. Mediante la comparación de estos datos con los de la CHA teórica, ha sido posible deducir que sobre la superficie de la muestra precipita una nueva fase apatita después de un tiempo de inmersión en SFA.

Los diferentes cambios en el perfil de concentración de los iones observado a lo largo de la interfaz del vitrocerámico/SFA, figura 8.9, indican que con respecto a los iones de fósforo, los iones de calcio y silicio difunden desde el interior del vitrocerámico hasta la interfaz del SFA hasta una distancia de  $15 \mu\text{m}$ . El proceso de difusión de los iones ocurre a través de los poros de la capa de reacción formada por la disolución de la fase amorfa residual y de la wollastonita-2M del vitrocerámico (véase figuras 8.8 y 8.9). Esto explica porque después de tres semanas, el contenido de Si en el SFA aún continúa aumentando (véase figuras 8.1).

Las transformaciones observadas en la superficie del vitrocerámico y en el SFA permiten establecer el mecanismo de reacción entre el vitrocerámico y el SFA.

La formación de la capa de CHA sobre la superficie de la muestra tiene lugar mediante interdifusión seguida de reacción entre los principales componentes del SFA ( $\text{H}_3\text{O}^+$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ) y del vitrocerámico ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{HSiO}_3^-$  y  $\text{HPO}_4^{2-}$ ). Este proceso ocurre primero a través de los bordes de grano y posteriormente a través de la porosidad generada dentro del material durante las primeras etapas del proceso (figuras 8.4A-B y 8.8A-B). Una vez formada la capa de CHA las diferentes especies iónicas difunden a través de esta capa y la

reacción continua (figuras 8.8C-D y 8.9). Los resultados de MET-DAS-EDS han sido esenciales para entender el proceso de formación de la capa CHA. La Figura 8.6A muestra una imagen MET de alta resolución, correspondiente al producto formado sobre la superficie del vitrocerámico después de 3 días en SFA. La difracción de un área seleccionada (DAS) de este polvo, figura 8.6B, indica que está formado principalmente por partículas del material de partida, ya que algunos puntos de difracción corresponden a la wollastonita-2M. Por otro lado, la figura 8.6G muestra la microestructura del producto formado en la superficie del vitrocerámico después de 21 días de estudio, el correspondiente DAS, figura 8.6H, muestra claramente un crecimiento preferente de los cristales de CHA en la dirección 002. Esta observación está de acuerdo con los resultados de MEB-EC-EDS presentados en la figura 8.3D y 8.5, donde se observa que la capa de CHA está formada por partículas con morfología de placa y con una orientación preferente. Al comparar los resultados DAS para el producto formado en la superficie del vitrocerámico después de 14 días y 21 días (figuras 8.6F y 8.6H, respectivamente), se observa un aumento de la cristalinidad del mismo después de 21 días, ya que el arco (002) es más prominente. Con estos datos obtenidos por MET-DAS se confirma que la cantidad de la nueva fase de CHA, formada sobre la superficie del vitrocerámico, es función del tiempo de inmersión en SFA.

Por otro lado, el producto formado en la superficie de la muestra después de 7 días en SFA contiene sílice amorfa (véase figura 8.7). La presencia de esta capa amorfa de sílice, observada por otros autores en estudios de bioactividad in vitro en SFA [1-4], no ha sido detectada en el estudio de las secciones transversales del vitrocerámico por MEB-EC-EDS (Figuras 8.8 y 8.9), lo que indica que esta capa es discontinua o muy fina y solo puede ser detectada mediante MET-EDS-DAS, que opera a altos niveles de resolución.

Cuando el vitrocerámico se encuentra en contacto con fluidos del cuerpo, las variaciones del pH en la interfaz con el material son muy importantes. Cambios muy significativos del pH pueden dar lugar a necrosis de las células en contacto con el material. Las variaciones del pH del SFA (figuras 8.2) durante todo el período de estudio no han sido significativas ( $7,40 \pm 0,02$  a  $7,50 \pm 0,05$ ). En estos rangos de pH la fase más estable es la apatita deficiente en calcio ( $(Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x})$  ( $0 < x < 1$ )  $Ca/P=1.5-1.67$ , pH 6.5-9.5) [5].

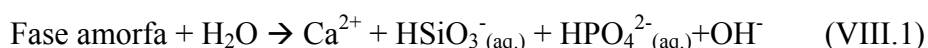
Es conocido que los osteoblastos prefieren condiciones moderadamente alcalinas (pH=7,5 a 8,0), y además que los cambios de pH causan importantes daños en la viabilidad celular [6;6-10]. Para el vitrocerámico desarrollado en el presente trabajo, se ha encontrado que en

los ensayos de SFA los valores de pH obtenidos son favorables. Por lo tanto se espera que presente una respuesta celular favorable, los estudios *in vitro* con cultivos celulares se discutirán en el siguiente capítulo.

Los resultados obtenidos en esta sección permiten establecer el mecanismo de formación de la CHA sobre la interfaz vitrocerámico/SFA como sigue:

(1) Al inicio del experimento ocurren simultáneamente dos reacciones:

(a) El SFA en contacto con el vitrocerámico reacciona la fase amorfa del material disolviéndola según la siguiente reacción.

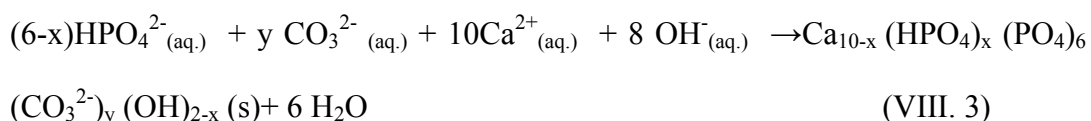


(b) La fase wollastonita 2M en contacto con el SFA comienza a reaccionar mediante el intercambio iónico de  $2\text{H}_3\text{O}^+$  del SFA por el  $\text{Ca}^{2+}$  de la red wollastonita 2M.



(2) Con la liberación de iones de calcio y fósforo desde las fases wollastonita 2M y fase amorfa del vitrocerámico, se forman varios grupos Si-OH sobre la superficie del mismo formando una fase amorfa rica en silicio, estos grupos silanol inducen la nucleación heterogénea de apatita.

Cuando la actividad iónica en el SFA en la zona cercana a la interfaz alcanza el producto de solubilidad de la CHA, esta fase comienza a precipitar sobre la superficie del vitrocerámico. Este proceso ocurre en menos de 7 días.



(3) Una vez que la apatita nuclea sobre la superficie de la zona porosa del vitrocerámico, continúa creciendo de forma espontánea consumiendo los iones calcio y fósforo presentes en la solución de SFA.

Sainz y col. [11] han simulado termodinámica la solubilidad de algunas de las fases que intervienen en la reacción mediante el programa HSC, estos autores establecen que la

solubilidad de la wollastonita 2M en SFA es más rápida que la de Apatita, esta simulación coincide con los resultados encontrados en el presente trabajo.

Los resultados obtenidos indican que la morfología generada en la interfaz vitrocerámico/SFA está controlada por la diferencia de solubilidad de las diferentes fases, lo que genera cambios en la química y topografía de la superficie del vitrocerámico. Las fases con mayor solubilidad (fase amorfa >wollastonita-2M>>>apatita) controlan la velocidad de formación de la capa de CHA sobre la superficie del vitrocerámico.

### **VIII.5.Conclusiones**

Las conclusiones que se pueden establecer en este estudio de la bioactividad en SFA para el vitrocerámico Ap dCa-wollastonita2M, son:

- (1) El vitrocerámico al ser expuesto al SFA libera principalmente iones Ca y Si, debido a la disolución de la fase amorfa y la wollastonita-2M, lo que produce la precipitación de una capa de nanocristales de tipo apatita sobre la superficie del material. Esta capa alcanza cerca de 4  $\mu\text{m}$  de espesor en menos de 21 días.
- (2) Las fases con mayor solubilidad, la fase amorfa y la wollastonita-2M, controlan la formación de la capa CHA sobre la superficie del vitrocerámico.
- (3) Los resultados demuestran que la microestructura y la morfología generada en el suero fisiológico artificial fue controlada por las diferentes velocidades de disolución de las fases. Este mecanismo produce la formación in situ de una estructura porosa de apatita residual interconectada, la cual se espera que mejore la osteoconducción.

### **VIII.5.Conclusions**

The conclusions that can be set about the bioactivity in the SFA for Ap dCa-wollastonite2M, are:

- (1) . The glass ceramic exposed to the SBF releases predominantly Ca and Si ions, due to the dissolution of the amorphous phases and wollastonite-2M, leading to the

formation of an apatite-like layer onto the surface of the material. This layer reached about 4 microns thickness in less than 21 days.

- (2) The phases with the highest solubility rate like amorphous phase and wollastonite 2M control the newly formed CHA layer on the surface of the glass ceramic.
- (3) The results evidenced that microstructure and morphology generated in the simulated physiological media was controlled by different solubility rates of the phases. This mechanism leads to the “*in situ*” formation of an interconnected porous structure of residual apatite, which is expected to promote the bone ingrowths.

## REFERENCIAS

- [1] P. N. De Aza, F. Guitian, A. Merlos, E. LoraTamayo, and S. De Aza, "Bioceramics - Simulated body fluid interfaces: pH and its influence of hydroxyapatite formation," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 7, no. 7, pp. 399-402, 1996.
- [2] T. Kokubo, H. Kushitani, C. Ohtsuki, S. Sakka, and T. Yamamuro, "Chemical-Reaction of Bioactive Glass and Glass-Ceramics with A Simulated Body-Fluid," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 3, no. 2, pp. 79-83, 1992.
- [3] P. N. De Aza, J. M. Fernandez-Pradas, and P. Serra, "In vitro bioactivity of laser ablation pseudowollastonite coating," *Biomaterials*, vol. 25, no. 11, pp. 1983-1990, 2004.
- [4] H. Aguiar, E. L. Solla, J. Serra, P. Gonzalez, B. Leon, F. Malz, and C. Jager, "Raman and NMR study of bioactive Na<sub>2</sub>O-MgO-CaO-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>-SiO<sub>2</sub> glasses," *Journal of Non-Crystalline Solids*, vol. 354, no. 45-46, pp. 5004-5008, 2008.
- [5] S. V. Dorozhkin, "Calcium orthophosphate cements for biomedical application," *Journal of Materials Science*, vol. 43, no. 9, pp. 3028-3057, 2008.
- [6] W. K. Ramp, L. G. Lenz, and K. K. Kaysinger, "Medium Ph Modulates Matrix, Mineral, and Energy-Metabolism in Cultured Chick Bones and Osteoblast-Like Cells," *Bone and Mineral*, vol. 24, no. 1, pp. 59-73, 1994.
- [7] K. K. Kaysinger and W. K. Ramp, "Extracellular pH modulates the activity of cultured human osteoblasts," *Journal of Cellular Biochemistry*, vol. 68, no. 1, pp. 83-89, 1998.
- [8] A. Brandao-Burch, J. C. Utting, I. R. Orriss, and T. R. Arnett, "Acidosis inhibits bone formation by osteoblasts in vitro by preventing mineralization," *Calcified Tissue International*, vol. 77, no. 3, pp. 167-174, 2005.
- [9] K. K. Frick, L. Jiang, and D. A. Bushinsky, "Acute metabolic acidosis inhibits the induction of osteoblastic egr-1 and type 1 collagen," *American Journal of Physiology-Cell Physiology*, vol. 272, no. 5, p. C1450-C1456, 1997.
- [10] A. ElGhannam, P. Ducheyne, and I. M. Shapiro, "Formation of surface reaction products on bioactive glass and their effects on the expression of the osteoblastic phenotype and the deposition of mineralized extracellular matrix," *Biomaterials*, vol. 18, no. 4, pp. 295-303, 1997.
- [11] Sainz MA, Pena P, Serena S, De Aza S, Caballero A. In Vitro bioactivity of new CaSiO<sub>3</sub> – CaMg(SiO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> bioceramics. *Acta Biomaterialia* (pdf on line).

## **CAPÍTULO IX**

### **ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE CULTIVO CELULARES**





## **IX. ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD DEL VITROCERÁMICO APATITA-WOLLASTONITA 2M MEDIANTE CULTIVO CELULARES<sup>1</sup>**

### **IX.1.Introducción**

En el presente capítulo se estudia la biocompatibilidad del vitrocerámico de Ap dCa y wollastonita 2M mediante estudios *in vitro* de cultivos celulares de células madre de médula ósea humana (HBMSC siglas en inglés).

### **IX.2.Condiciones de estudio**

El experimento se realizó utilizando células madre y el vitrocerámico desarrollado en el presente trabajo como sustrato.

#### **IX.2.1.Células Madre de Médula Ósea Humana**

Se ha estudiado la respuesta biológica del vitrocerámico usando células madre de médula ósea humana (HBMSC), las cuales se utilizan frecuentemente para estudiar la respuesta de las células en contacto con un biomaterial [1-4].

Las HBMSC han sido obtenidas de un paciente de 14 años sometido a una operación quirúrgica de cadera. El paciente permitió el uso del material biológico para estudios *in vitro*. El experimento se realizó durante una estancia predoctoral en el Instituto de Engenharia Biomédica de Porto-Portugal (INEB) siguiendo el procedimiento aprobado por su comité de ética.

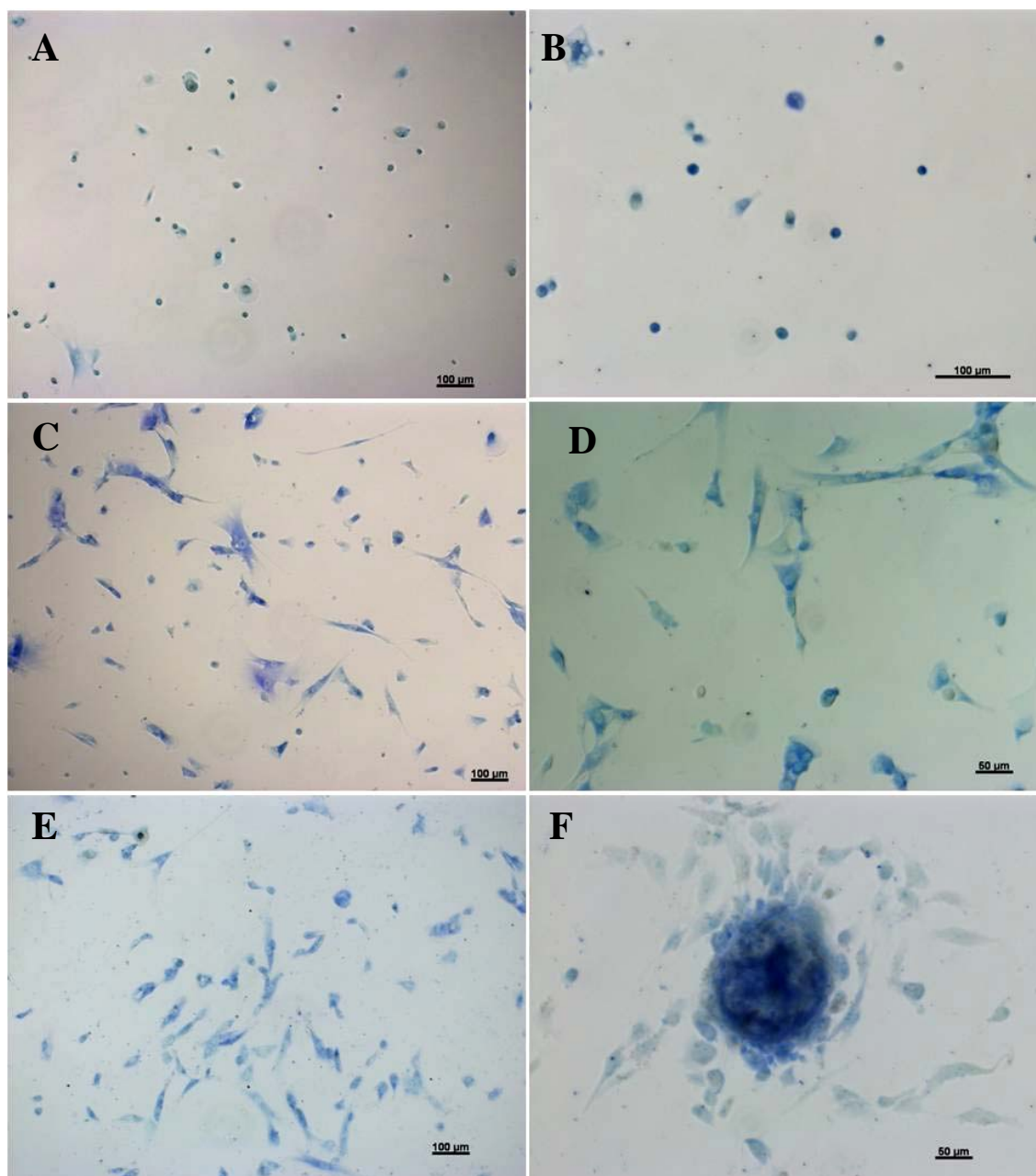
Las células obtenidas del paciente han sido expandidas siguiendo el procedimiento experimental descrito en la sección 3.8 del capítulo III.

Las células necesarias para el experimento se obtuvieron después de un pasaje 5. Antes de la siembra de las células sobre el vitrocerámico (sustrato) se estudió su adhesión celular después de 4, 24 y 48 horas. En esta etapa se usaron placas de poliestireno especiales para cultivo celular, en cada pozo fue colocado un cubreobjeto de vidrio sobre el que se sembraron las células, la densidad fue de  $3 \times 10^4$  células por pozo.

---

<sup>1</sup>Partes de este capítulo se han publicado en:  
- **Acta Biomaterialia**. Vols x, pp xxxx–xx (2010).  
Pdf on line (<http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.027>).

Después de cada tiempo de estudio las células viables fueron marcadas con MTT, y se observaron en un microscopio óptico invertido marca *Zeiss Axiovert 200M* (figura 9.1). Se observó que después de 4 horas de siembra, figura 9.1A y 9.1B, las células todavía presentaban una forma circular, la cual es característica después de la tripsinización, este proceso se realizó con la finalidad de desprender las células del frasco de cultivo, para su siguiente siembra en los cubreobjetos.



**Figura 9.1.** Micrografías de las células madre de médula ósea coloreadas con MTT obtenidas en un microscopio óptico invertido. Estudio de adhesión celular después de (A-B) 4 horas, (C-D) 24 horas y (E-F) 48 horas.

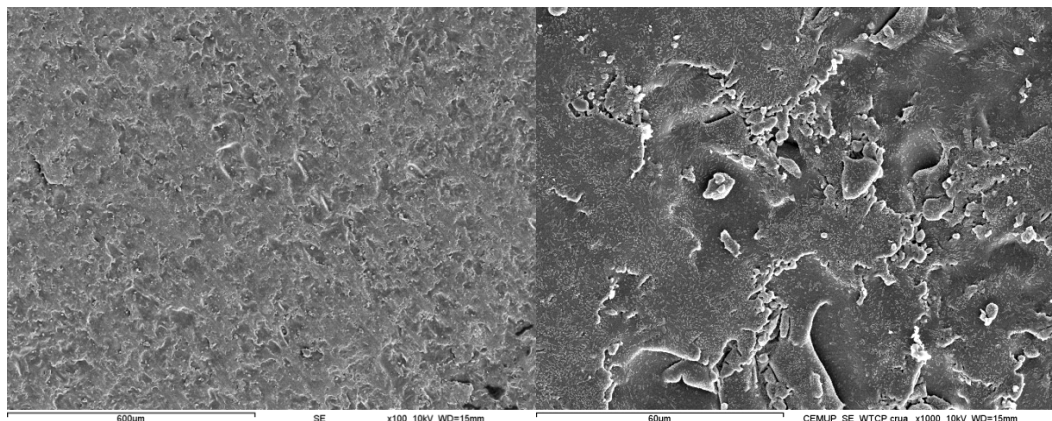
Después de 24 horas de cultivo, figura 9.1C y 9.1D, las células presentan una morfología alargada, observándose en algunas zonas la unión entre varias células, estas zonas aumentan después de 48 horas (figura 9.1E y 9.1F). Este ensayo de adhesión se ha realizado para determinar si las células presentan un comportamiento “normal” después de la etapa de expansión celular.

### IX.2.2. Vitrocerámico

Para los estudios *in vitro*, las muestras del vitrocerámico obtenido mediante el procedimiento establecido en el capítulo VII han sido cortadas en una microcortadora con un disco de corte recubierto con diamante hasta un tamaño de 3,5 x 3,5 x 3,5 mm<sup>3</sup>. Posteriormente, se han limpiado durante 30 minutos en un baño de ultrasonidos colocándolas en un recipiente con acetona.

Las muestras, esterilizadas mediante un tratamiento de 20 minutos a 120°C en una estufa, se colocaron en platos de cultivo de 24 pozos no tratados, para evitar la adhesión celular en el fondo.

La superficie del vitrocerámico, antes del experimento, ha sido caracterizada mediante MEB-EC. Este análisis revela una superficie irregular (figura 9.2).



**Figura 9.2.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC en las que se puede observar la textura de la superficie del vitrocerámico antes de los estudios *In vitro* con células madre de médula ósea.

### **IX.2.3.Siembra de células**

Las células han sido sembradas sobre el vitrocerámico con una densidad igual a  $5 \times 10^4$  células por pozo, y seguidamente se han colocado 500  $\mu$ l de medio de cultivo (suplementado con vitamina C, dexametasona y  $\beta$ -glicerolfosfato) y mantenido en una incubadora a 37°C durante 4 horas para permitir la adhesión celular. Después, se añadió medio de cultivo hasta alcanzar un volumen de 2 ml por pozo.

Las HBMSC han sido sembradas sobre el vitrocerámico durante 1, 3, 7, 14 y 21 días.

### **IX.2.4.Estudios de morfología y adhesión celular**

Después de cada tiempo de cultivo las muestras han sido tratadas como se indica en la sección III.8.3 del capítulo III, y mediante MEB-EDS y microscopía confocal de barrido láser (MCBL) se han estudiado la morfología y la adhesión celular. Con fines comparativos, el secado de las muestras para su estudio por MEB se realizó por dos métodos: hexametildisilazano y punto crítico, ya que el primero es una técnica económica, mientras que el segundo requiere de un equipo especial. Además el usar dos técnicas permite evaluar y evitar cualquier influencia de los resultados debido al método de preparación.

En los estudios por MEB, se han realizado dos tipos de controles (+) y (-). Para el primero se sembraron las células sobre cubreobjetos y en el segundo caso se expuso el vitrocerámico al medio de cultivo sin células.

### **IX.2.5.Cuantificación celular**

Para cada tiempo de estudio se ha cuantificado las células viables presentes mediante el ensayo de proteína total (véase sección III.8.3 del capítulo III). Con el objetivo de comparar los resultados obtenidos para el vitrocerámico se ha realizado un control (+), donde las células se han sembrado en cubreobjetos.

### **IX.3.Resultados**

Los resultados obtenidos durante los estudios en cultivos celulares se han dividido en dos secciones: morfología-adhesión celular y cuantificación celular.

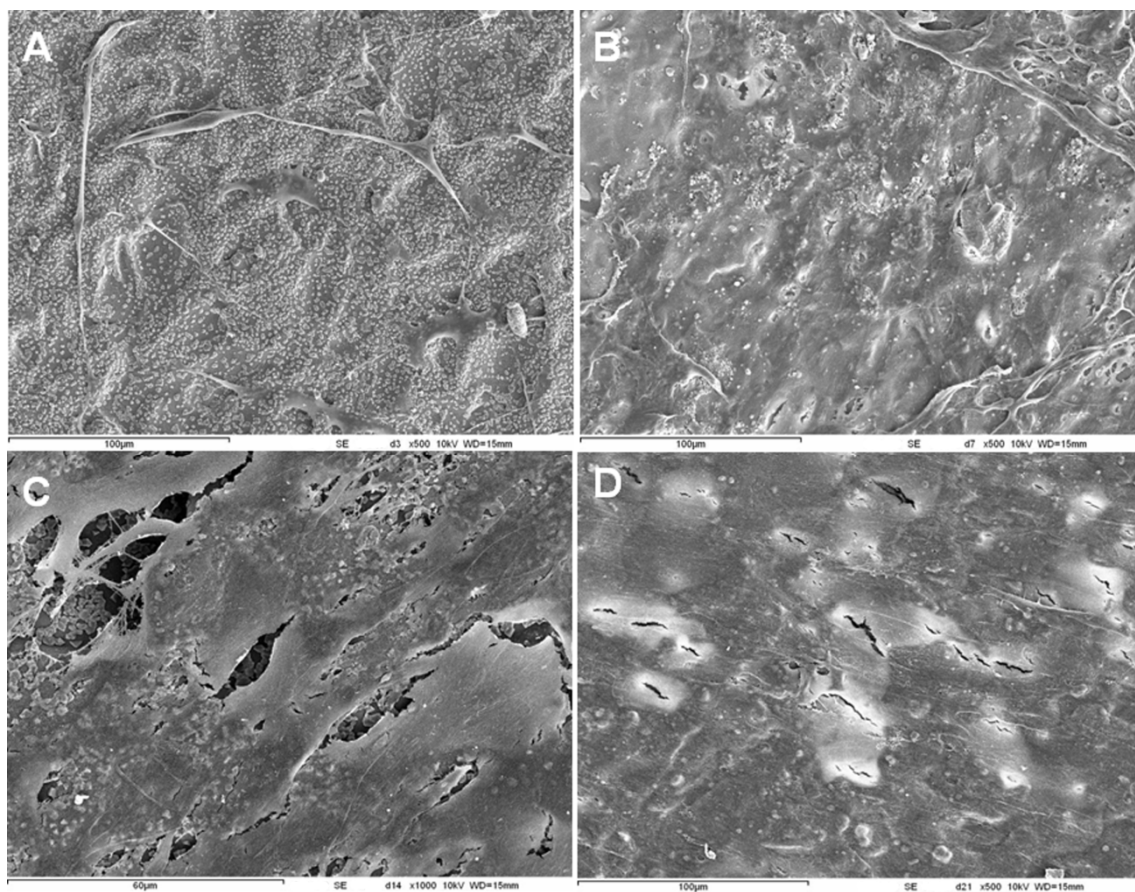
#### **IX.3.1.Morfología y adhesión celular**

Las imágenes obtenidas mediante MEB-EC (figuras 9.3 y 9.4) de la superficie del vitrocerámico, después de diferentes días de cultivo con células madre de médula ósea muestran una alta adhesión y proliferación de las células. Se observa un contacto íntimo de estas con la superficie del vitrocerámico.

Después de 3 días de incubación (figuras 9.3A y 9.4A), las células muestran una morfología osteoblástica típica con forma poligonal extendida, también se observa una adaptación de las extensiones citoplasmáticas a la superficie del vitrocerámico.

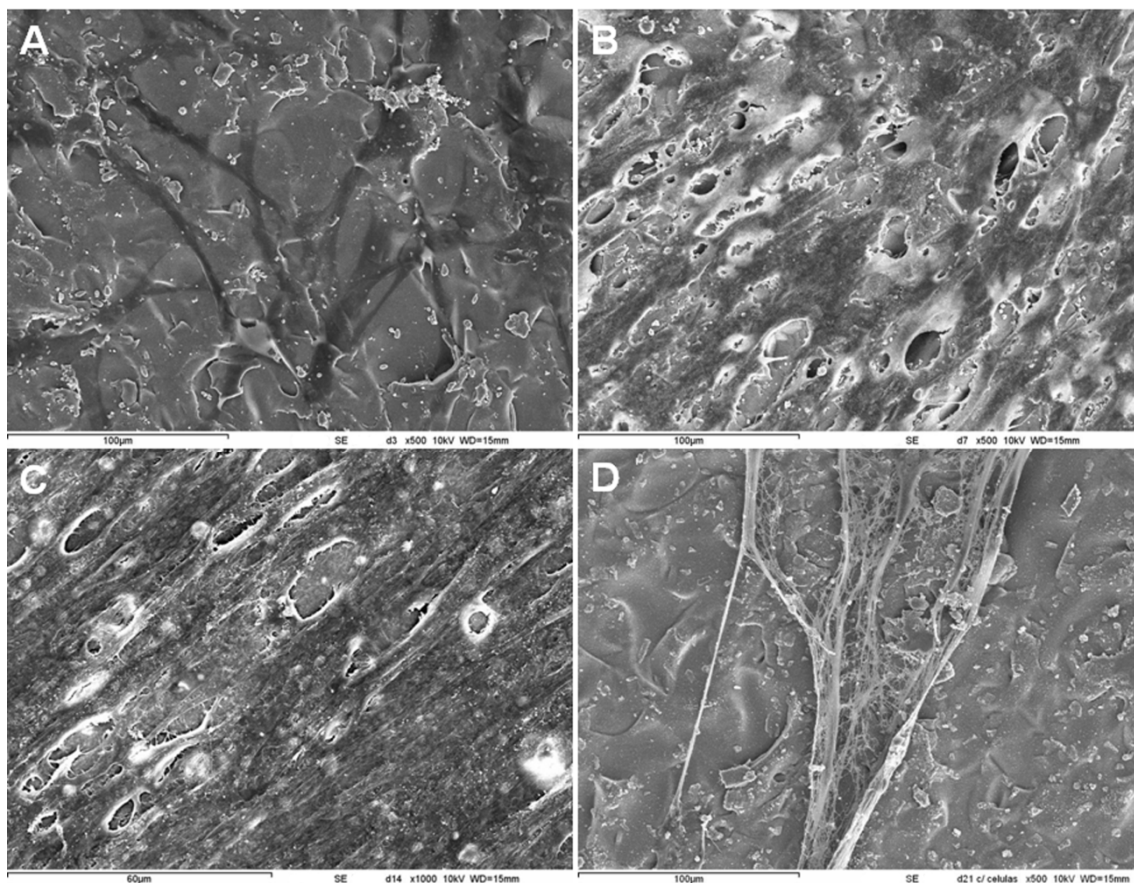
A los 7 días de cultivo (figuras 9.3B y 9.4B), las células se presentan en la superficie del vitrocerámico con una morfología extendida-plana y se observa contacto entre ellas. Las células en este período de estudio comienzan a formar una capa densa que recubre la superficie del vitrocerámico.

La capa de células que se observa después de 7 días de cultivo, aumenta su continuidad después de 14 días (figuras 9.3C y 9.4C), pero aún es posible observar la superficie del material.



**Figura 9.3.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie de las probetas de vitrocerámico preparadas mediante punto crítico. Días de cultivo: (A) 3, (B) 7, (C) 14 y (D) 21.

Después de 21 días de cultivo (figuras 9.3D y 9.4D), en el caso de la preparación de la muestra mediante el método del punto crítico (figura 9.3D), la superficie del vitrocerámico se encuentra totalmente cubierta con una capa homogénea de células que impide observar la superficie del material. Es posible intuir la topografía del vitrocerámico, lo que indica una buena adhesión de las células a la superficie del mismo. Para la muestra preparada mediante el método de hexametildisilazano (figura 9.4D), no se observa la superficie del material totalmente cubierta, por el contrario solo una pequeña zona presenta células debido a que en esta área no se han sembrado las mismas. Esto indica que el vitrocerámico promueve la proliferación celular, ya que se observan células donde no se han sembrado, por lo tanto éstas se han expandido y proliferado.

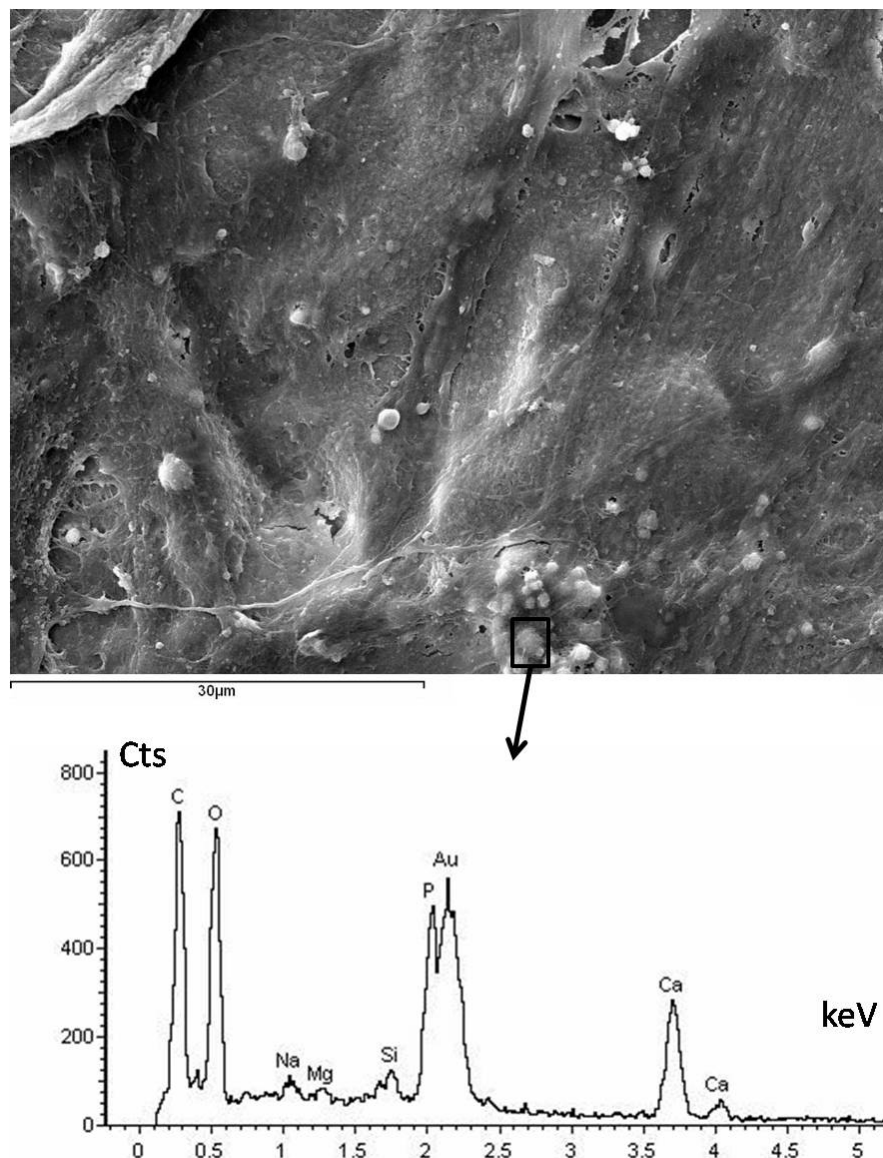


**Figura 9.4.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie de las probetas de vitrocerámico preparadas mediante hexametildisilazano. Días de cultivo: (A) 3, (B) 7, (C) 14 y (D) 21.

Los resultados obtenidos usando el método del punto crítico y hexametildisilazano indican que ambas técnicas pueden ser usadas en la preparación de muestras para ser observadas al MEB. En el caso del método del punto crítico se forman algunas grietas en la capa de células. Por otro lado, mediante el método de hexametildisilazano se observa alguna contracción de las células.

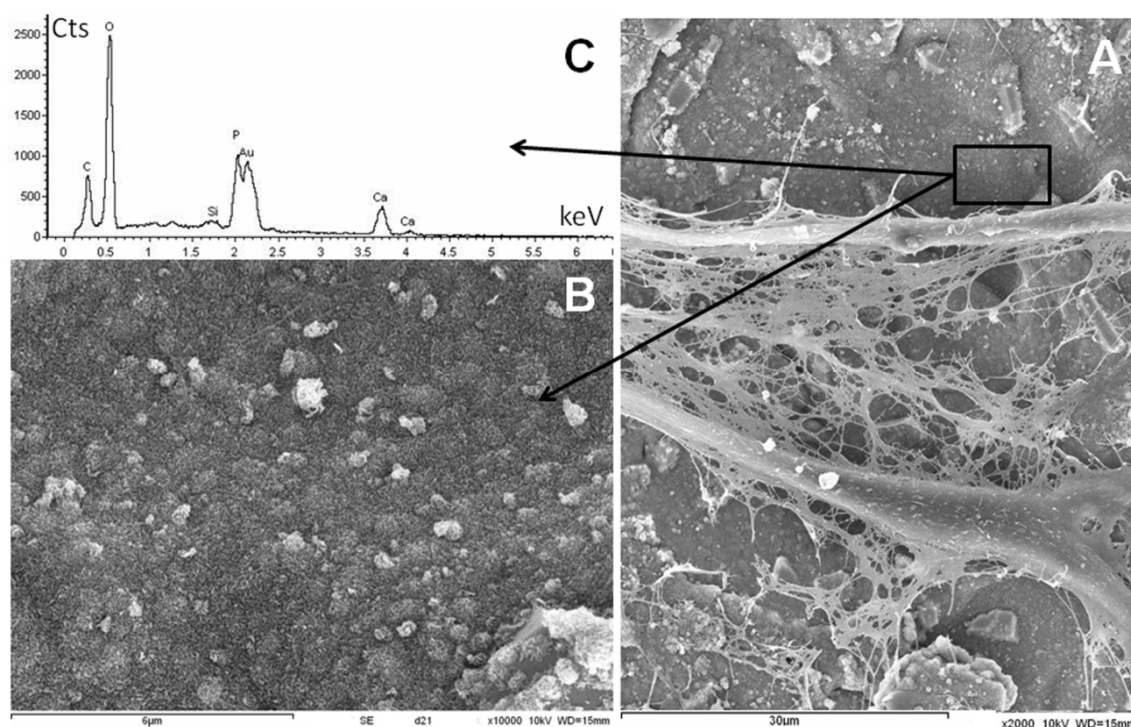
Después de 7 días de cultivo es posible observar agregados aislados, mediante microanálisis por MEB-EDS se ha determinado que principalmente contienen Ca y P (Figura 9.5). La señal correspondiente al elemento Au proviene del recubrimiento realizado a la muestra que permite su observación al MEB-EDS.





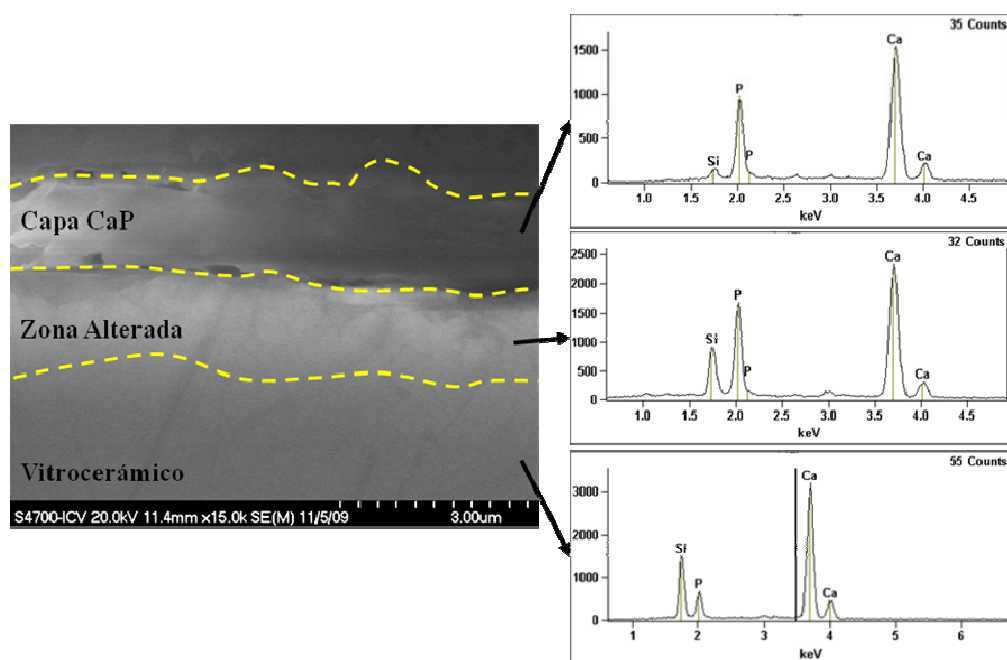
**Figura 9.5.** Micrografías y microanálisis obtenidos mediante MEB-EC-EDS de la superficie del vitrocerámico después de 7 días de cultivo con células madre. Método de preparación: punto crítico.

En la figura 9.6 se muestra una cara lateral de la muestra cúbica del vitrocerámico donde no se han sembrado células. Es posible observar que después de 21 días de cultivo las células han proliferado, encontrándose en zonas donde no se ha realizado la siembra de las mismas y que son menos propicias por su ubicación. Cuando se compara la superficie original del vitrocerámico (figura 9.2) con la superficie después de 21 días de cultivo (figura 9.6) es posible observar que la misma se ha alterado, formándose agregados uniformes con estructura globular con un tamaño de  $\sim 2\mu\text{m}$  (figura 9.6B). Los resultados del microanálisis MEB-EDS de esa área indican que los elementos mayoritarios presentes son Ca y P (figura 9.6C)



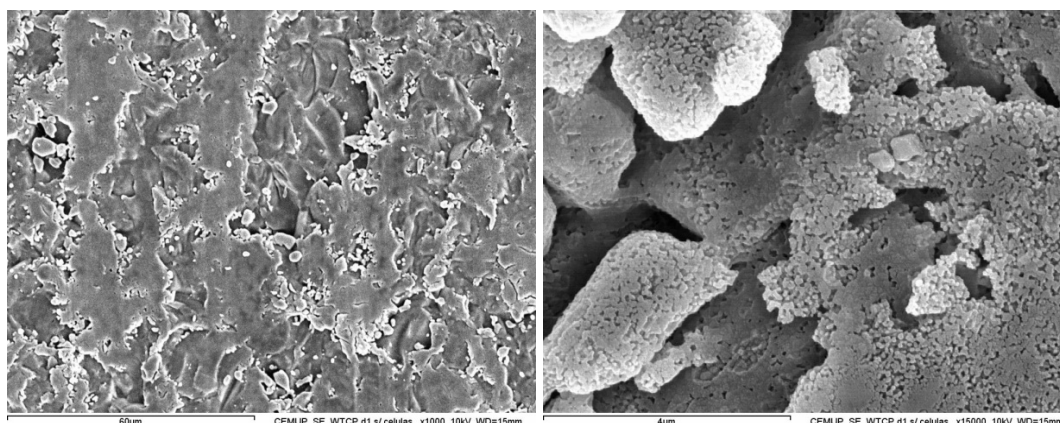
**Figura 9.6.** Micrografías y microanálisis obtenidos mediante MEB-EC-EDS de la superficie de un lateral del vitrocerámico donde no se han sembrado células, después de 21 días de cultivo. (A) Se observan células, (B) Detalle de una zona, donde se observa que el vitrocerámico ha reaccionado con el medio de cultivo y las células, formando agregados con morfología típica de apatita, (C) Microanálisis por MEB-EDS de la zona alterada donde se observa la presencia mayoritaria de Ca y P. La muestra ha sido recubierta con oro (Au). Se detecta C procedente de las células.

En la figura 9.7 se muestra la sección transversal de la muestra después de 21 días de cultivo, se puede observar la formación de tres zonas: una capa rica en Ca y P, una zona alterada, y el material original (vitrocerámico). Se ha determinado que la zona alterada presenta un contenido bajo de Si, si se compara con la composición original, lo que indica que se están disolviendo las fases que contienen importantes cantidades de Si (fase amorfa y wollastonita-2M, véase capítulo VII).



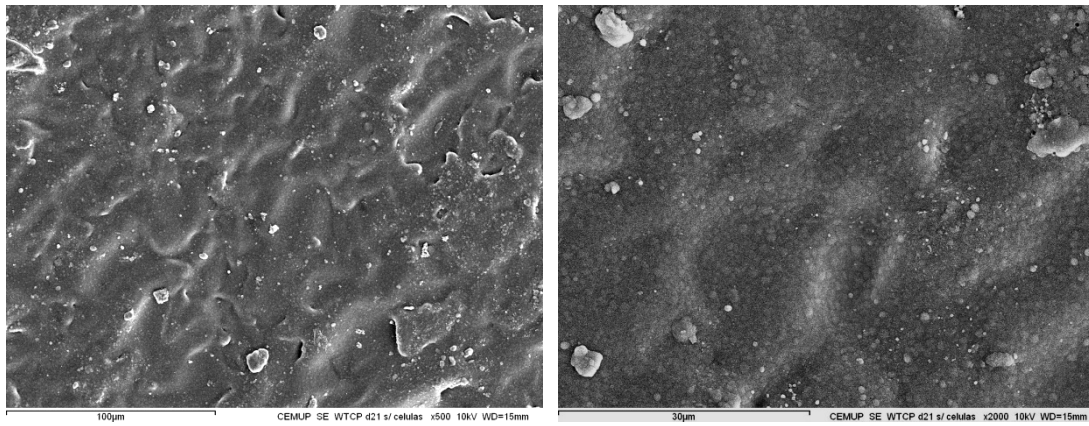
**Figura 9.7.** Micrografías y microanálisis obtenido mediante MEB-EC-EDS de la sección transversal de la muestra después de 21 días de cultivo con células madre de médula ósea.

Como se indicó en las condiciones de estudio (sección IX.2.4 del presente capítulo), se han realizado controles (-) y (+) en el ensayo adhesión y morfología mediante MEB, con el fin de determinar el comportamiento del material en el medio de cultivo sin células y el comportamiento de las células sin el material de estudio, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 9.8, 9.9 y 9.10.



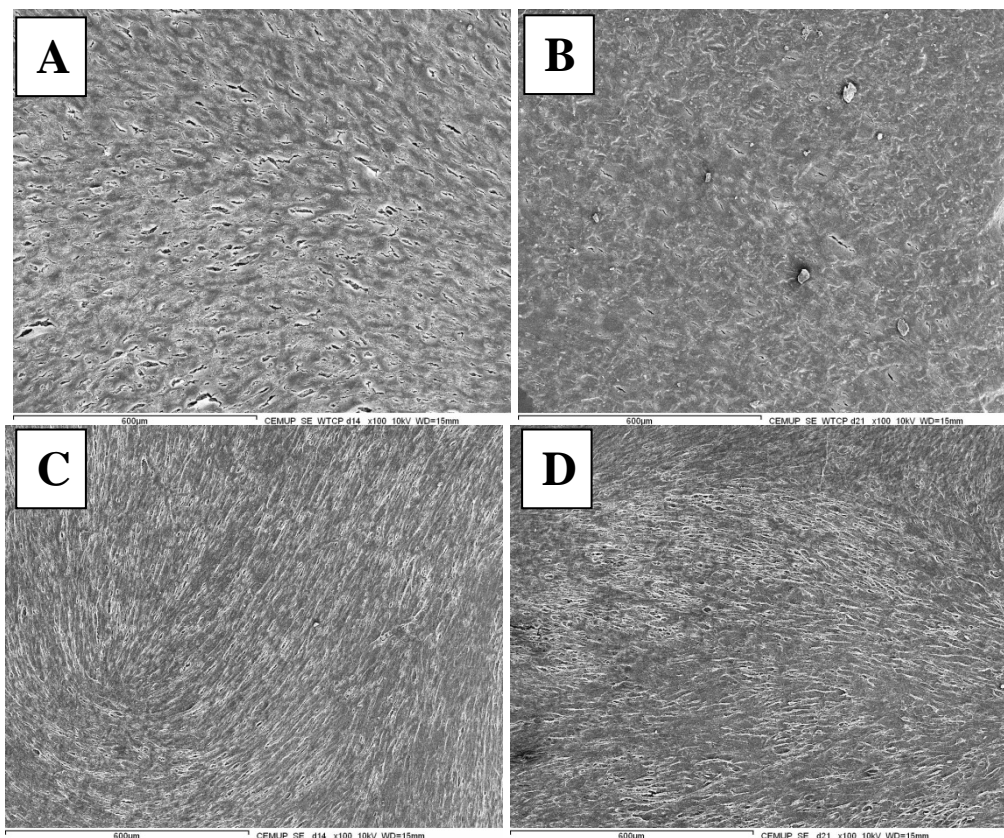
**Figura 9.8.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vitrocera después del control (-) realizado mediante inmersión durante 1 día en el medio de cultivo sin células.

En la figura 9.8 se observan zonas disueltas del vitrocera, debido a la reacción de éste con el medio de cultivo, esta disolución ocurre durante el primer día de cultivo.



**Figura 9.9.** Micrografías obtenidas mediante MEB-EC de la superficie del vitrocerámico después del control (-) realizado durante 21 días en el medio de cultivo sin células.

En la figura 9.9 se muestra la superficie del material para el control (-) después de 21 días de estudio, es posible observar agregados formados en la misma.



**Figura 9.10.** Micrografías de la superficie del vitrocerámico (A-B) y del cobreobjeto, control (+) (C-D), obtenidas mediante MEB-EC. Preparación: Punto crítico.

Los resultados para el control (+) se muestran en las figuras 9.10 C y 9.10D. Con el fin de comparar los resultados se muestran también los obtenidos para el vitrocerámico con células (figuras 9.10 A y 9.10B). Es posible observar una mayor adhesión de las células en el sustrato vitrocerámico, ya que presentan una morfología más plana y se puede intuir la topografía del vitrocerámico.

La morfología y adhesión celular también han sido estudiadas mediante microscopía confocal de barrido láser (MCBL), los resultados se muestran desde la figura 9.11 a la 9.15.

En la figura 9.11 es posible observar que la cantidad de células presentes en el vitrocerámico aumenta con el tiempo de cultivo.

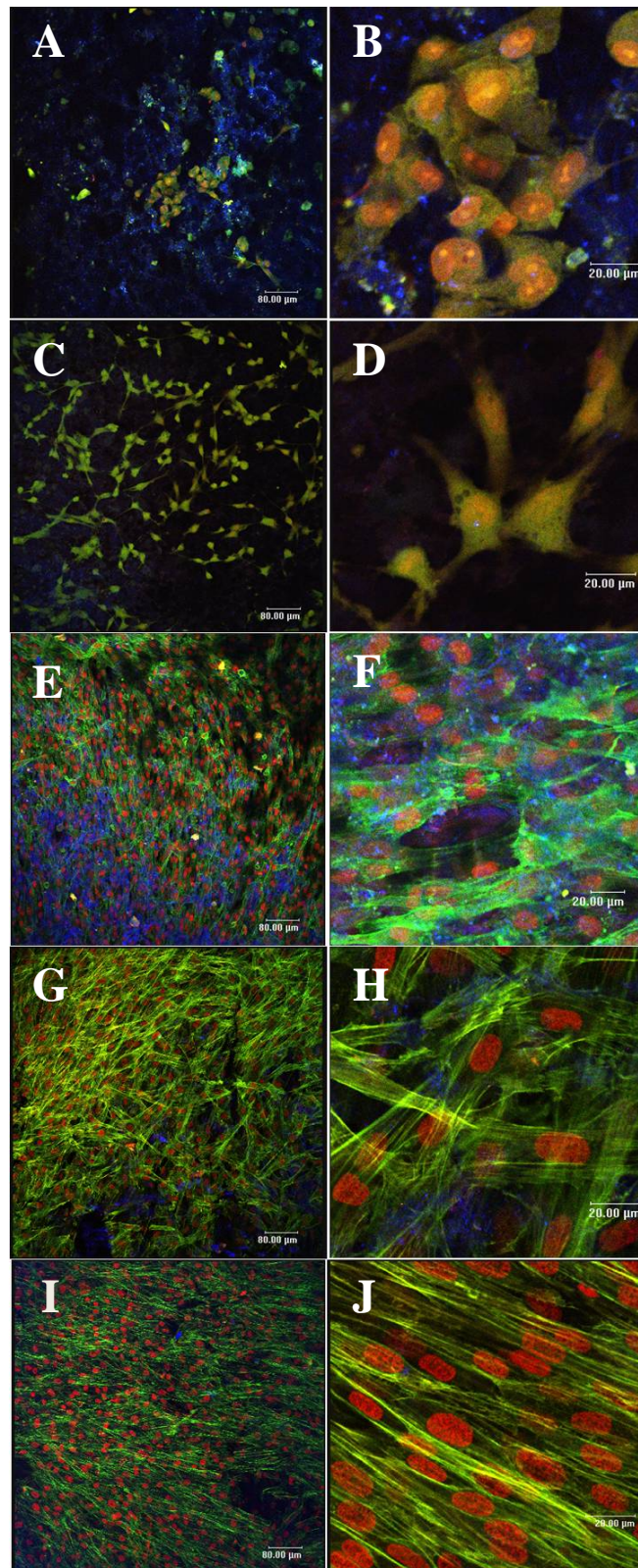
Para los primeros estadios, día 1 (figuras 9.11A, 9.11B y 9.12), es posible observar clúster de células, también se observan células en etapa de división, donde en un mismo filamento (zona verde) se encuentran dos núcleos (rojo).

Después de 3 días de cultivo (figuras 9.11C y D), se observa que las células presentan una morfología alargada, con algunas en contacto entre sí.

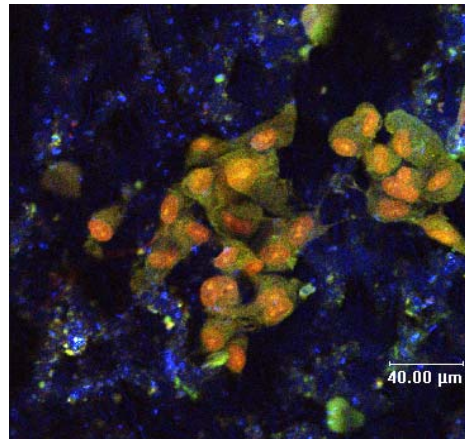
Para 7 días de cultivo (figuras 9.11E y F), la cantidad de células aumenta considerablemente, y se observa la formación de una capa, pero aún es visible la superficie de la muestra (zona azul).

Después de 14 días de cultivo las células forman una capa continua (figura 9.11G), estas presentan diferentes orientaciones (figura 9.11F), pero después de 21 días de cultivo las células están organizadas en un mismo sentido (figuras 9.11G y H).



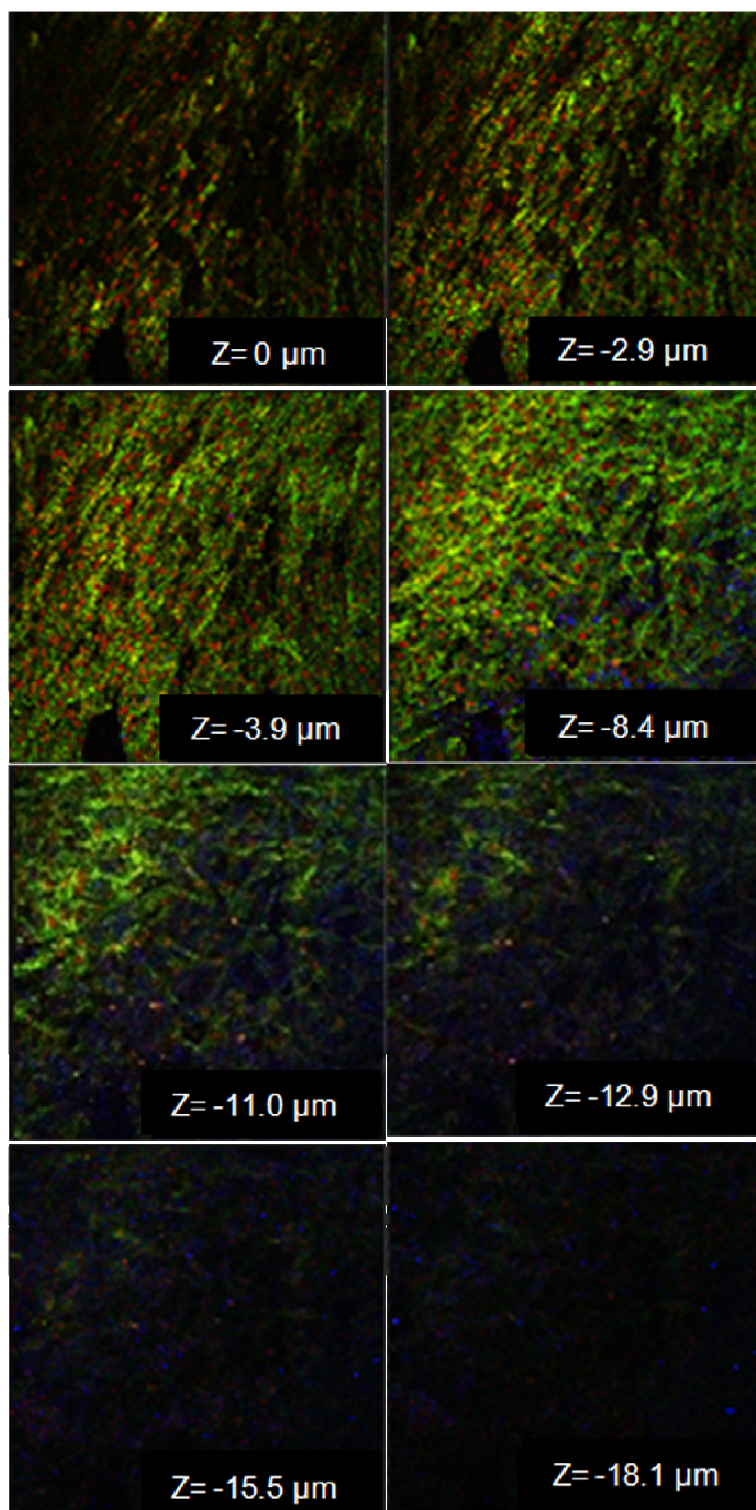


**Figura 9.11.** Micrografías obtenidas mediante MCBL de la superficie del vitrocerámico después de (A-B) 1 día, (C-D) 3 días, (E-F) 7 días, (G-H) 14 días y (I-J) 21 días de cultivo.



**Figura 9.12.** Micrografías obtenidas mediante MCBL de la superficie del vitrocerámico después de 1 día de cultivo.

En la figura 9.13 se muestran micrografías para diferentes profundidades de la muestra después de 21 días de cultivo, estas indican que es posible que se haya formado más de una capa de células ya que el grosor de una célula está cercano a 5μm.



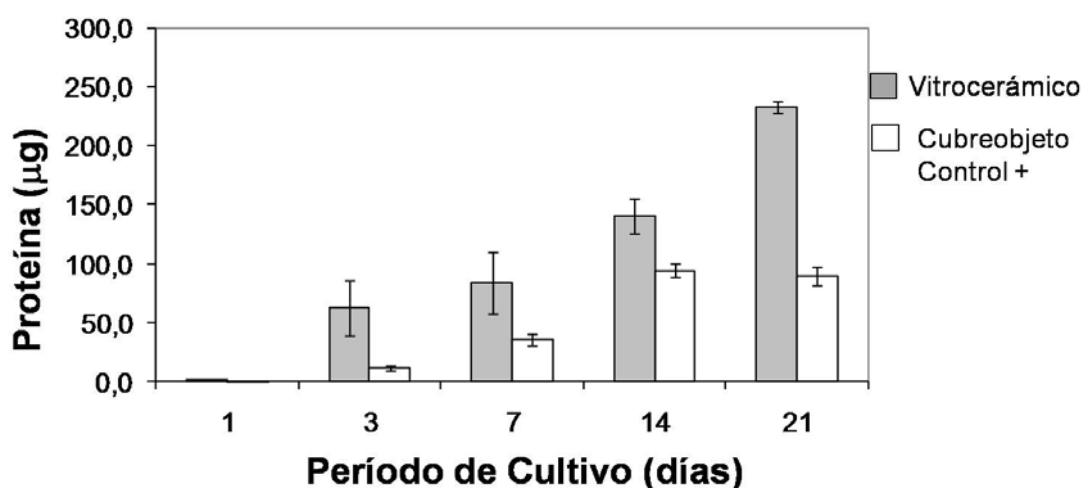
**Figura 9.13.** Micrografías obtenidas mediante MCBL de la superficie del vitrocerámico después de 21 días de cultivo. Z indica la profundidad.



### IX.3.2. Cuantificación celular

Los ensayos de proteína total se han realizado con el objetivo de cuantificar las células viables presentes en las muestras, después de cada periodo de cultivo. Con el fin de comparar los resultados obtenidos para el vitrocerámico se ha realizado un control (+) sembrando células sobre cubreobjetos.

La figura 9.14 muestra los resultados de proteína total para cada período, estos indican que el contenido de proteína que está presente en el vitrocerámico es mayor que para el control (+) durante todo el período de estudio. Para el último día de estudio, 21 días de cultivo, la cantidad de proteína disminuye para el control, mientras que para las muestras de vitrocerámico continúa aumentando. Esto indica que para 21 días de cultivo en las muestras de control probablemente se ha alcanzado el estado de diferenciación, mientras que para las muestras de vitrocerámico continúan en un estado de proliferación. Mediante MEB no se observa ninguna evidencia de formación de agregados de Ca y P (o nuevo hueso) en el control (+), en contraposición para las muestras de vitrocerámico se ha observado la posible formación de agregados de Ca y P (figura 9.5). Debido a que las células proliferan fácilmente en el vitrocerámico, ya que se han encontrado en zona lateral del vitrocerámico donde no se han sembrado, existen zonas donde aún se encuentran en proliferación y otras en diferenciación y por esto no se observa una disminución en el contenido de proteína total para ningún período de estudio.



**Figura 9.14.** Contenido de proteína total para cada período de cultivo. Se han representado los datos para el vitrocerámico y para el control (+)

#### **IX.4.Discusión**

El vitrocerámico desarrollado presenta una superficie bioactiva rugosa que muestra la formación de una capa de CaP después de ser expuesto al medio de cultivo con/sin células. Esta capa de tipo apatita tiene un importante papel en la unión química primaria del material en el caso de implantación en un tejido óseo receptor.

Los resultados de crecimiento y proliferación celular de las células madre de médula ósea humana sobre el vitrocerámico han demostrado que después de 7 días de cultivo, la distribución de las células sobre el material es muy homogénea y están altamente y uniformemente adheridas a la superficie del mismo. Esto demuestra que el material desarrollado en la presente tesis es biocompatible con alta velocidad de colonización y proliferación.

El proceso de adhesión y proliferación celular podría estar influenciado por la topografía del sustrato (rugosidad, porosidad, simetría regularidad a escala nanométrica, carga de la superficie, etc.) ya que los materiales con superficie rugosa inducen una mejor adhesión celular que aquellos con superficie lisa como el plástico [5].

Adicionalmente, HBMSC han presentado niveles de adhesión celular sobre superficies rugosas duras con morfología irregular, más altos que sobre superficies blandas [5]. Las muestras de vitrocerámico estudiadas en esta sección presentan una superficie morfológicamente rugosa, como se muestra en la figura 9.2. Por lo tanto, las propiedades de la superficie del vitrocerámico pueden ayudar a estimular la adhesión de las células del tipo osteoblásticas.

Diversos estudios han demostrado [5-7] que la composición química de los sustratos es un parámetro importante en la respuesta biológica de las células. El estudio realizado no ha permitido analizar las diferencias en el comportamiento de las diferentes fases presentes (apatita, wollastonita-2M y fase amorfa). En condiciones osteogénicas, los niveles de adhesión de las células viables sobre la superficie del vitrocerámico son comparables con otras superficies de apatita [8] .

En lo que respecta a la composición mineralógica, diversos autores han comprobado que la adhesión mejora cuando los sustratos contienen apatita. La presencia de ésta en el vitrocerámico puede mejorar el proceso de adhesión celular en los primeros estadios del experimento probablemente porque los osteoblastos reconocen a la apatita como un sustrato natural.

Es importante resaltar que el efecto inducido por el vitrocerámico sobre la adhesión y proliferación de las células puede estar favorecido por la liberación de iones Si y Ca al medio y la formación de la capa de Ca y P discutida anteriormente (véase figuras 9.6 y 9.7). Este comportamiento está de acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo VIII. Como se ha discutido, el vitrocerámico expuesto a SFA libera iones Ca y Si, debido a la disolución de la fase amorfa y la wollastonita-2M, los cambios de composición en la interfaz vitrocerámico/medio de cultivo-células dan lugar a la formación de una capa de Ca y P sobre la superficie del vitrocerámico. Además, existen diferentes estudios que han encontrado un comportamiento similar de materiales de sílico fosfatos de calcio en SFA y en cultivos celulares [2;7;8]. Por lo tanto, la formación de la mencionada capa de Ca y P producida por la liberación de iones Ca y Si al medio estimula la proliferación osteoblástica.

Los resultados discutidos en este capítulo confirman que características tales como la composición y rugosidad permiten modular las respuestas *in vitro* de las células, incluyendo la colonización, proliferación, adhesión celular y la estructura de la superficie de la multicapa formada por osteoblastos.

## **IX.5.Conclusiones**

Los resultados obtenidos de la proliferación y crecimiento de las células madre de médula ósea humana sobre el material han demostrado que el vitrocerámico desarrollado en este estudio no es citotóxico, se ha observado una buena adhesión, extensión y proliferación celular por lo que el vitrocerámico puede considerarse biocompatible.

Por otro lado, se ha observado que el calcio y el silicio son elementos importantes en la formulación de un osteoimplante, ya que estimulan la actividad de las células. Además la rugosidad de la superficie es un parámetro importante en las respuestas biológicas básicas que aumenta la adhesión y la proliferación celular.

El vitrocerámico desarrollado es un material que puede servir como andamiaje para regeneración de tejido duro.

## **IX.5.Conclusions**

The results obtained from proliferation and growth of human bone marrow cells on the material have proven that the glass-ceramic developed in this study is not cytotoxic and cells strongly adhere to the substrate and quickly proliferate on it.

The essentiality role of co-treatment with Silicon and Calcium as accessory factors to enhance cell activity stimulation on phosphate based biomaterials has been highlighted. In addition, the surface roughness is an important parameter in the basic responses; that increase the cell adhesion and the proliferation.

The apatite-wollastonite 2M glass-ceramics could serve as a promising platform for regeneration of hard tissue.

## REFERENCIAS

- [1] M. P. Ferraz, M. H. Fernandes, J. D. Santos, and F. J. Monteiro, "HA and double-layer HA-P2O5/CaO glass coatings: influence of chemical composition on human bone marrow cells osteoblastic behavior," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 12, no. 7, pp. 629-638, 2001.
- [2] L. Meseguer-Olmo, A. Bernabeu-Esclapez, E. Ros-Martinez, S. Sanchez-Salcedo, S. Padilla, A. I. Martin, M. Vallet-Regi, M. Clavel-Sainz, F. Lopez-Prats, and C. L. Meseguer-Ortiz, "In vitro behaviour of adult mesenchymal stem cells seeded on a bioactive glass ceramic in the SiO2-CaO-P2O5 system," *Acta Biomaterialia*, vol. 4, no. 4, pp. 1104-1113, 2008.
- [3] P. Muller, U. Bulnheim, A. Diener, F. Luthen, M. Teller, E. D. Klinkenberg, H. G. Neumann, B. Nebe, A. Liebold, G. Steinhoff, and J. Rychly, "Calcium phosphate surfaces promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells," *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, vol. 12, no. 1, pp. 281-291, 2008.
- [4] L. Saldana, S. Sanchez-Salcedo, I. Izquierdo-Barba, F. Bensiamar, L. Munuera, M. Vallet-Regi, and N. Vilaboa, "Calcium phosphate-based particles influence osteogenic maturation of human mesenchymal stem cells," *Acta Biomaterialia*, vol. 5, no. 4, pp. 1294-1305, 2009.
- [5] K. T. Bowers, J. C. Keller, B. A. Randolph, D. G. Wick, and C. M. Michaels, "Optimization of surface micromorphology for enhanced osteoblast responses in vitro," *Int J Oral Maxillofac Implants*, vol. 7, no. 3, pp. 302-310, 1992.
- [6] J. Y. Martin, Z. Schwartz, T. W. Hummert, D. M. Schraub, J. Simpson, J. Lankford, D. D. Dean, D. L. Cochran, and B. D. Boyan, "Effect of Titanium Surface-Roughness on Proliferation, Differentiation, and Protein-Synthesis of Human Osteoblast-Like Cells (Mg63)," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 29, no. 3, pp. 389-401, 1995.
- [7] B. D. Boyan, R. Batzer, K. Kieswetter, Y. Liu, D. L. Cochran, S. Szmuckler-Moncler, D. D. Dean, and Z. Schwartz, "Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 alpha,25-(OH)(2)D-3," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 39, no. 1, pp. 77-85, 1998.
- [8] A. Y. P. Mateus, C. C. Barrias, C. Ribeiro, M. P. Ferraz, and F. J. Monteiro, "Comparative study of nanohydroxyapatite microspheres for medical applications," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 86A, no. 2, pp. 483-493, 2008.

## **CONCLUSIONES FINALES**



En los diferentes capítulos ya se han discutido los resultados obtenidos en el presente trabajo, en este apartado se presentan los aspectos sobresalientes que permiten alcanzar los objetivos parciales establecidos en el capítulo: *Propósito del trabajo*.

- Se ha obtenido el vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP, mediante el proceso de fusión-colado, de su caracterización se desprende que:

1).- Las propiedades mecánicas son comparables a otros vidrios bioactivos.

2).- Se ha validado la correlación entre el parámetro de Stevels y la bioactividad en SFA, establecida por Aguiar y col., y se ha establecido una relación empírica para predecir la bioactividad de vidrios de sílico-fosfatos alcalinos o alcalinotérreos:

$$\text{Espesor capa Ca y P } (\mu\text{m}) = \frac{2,679 - \text{Parámetro Stevels}}{0,174}$$

válida para  $0,82 \leq \text{parámetros de Stevels} < 2,679$

3).- El vidrio obtenido presenta una alta bioactividad en SFA, formando una capa de fosfatos de calcio de 24  $\mu\text{m}$  después de 21 días.

4).- Células MG63, provenientes de un osteosarcoma humano, sembradas sobre el vidrio presentaron alta adhesión y proliferación celular.

- De los estudios de desvitrificación del vidrio eutéctico W-TCP se puede concluir que:

1).- La difracción de neutrones, combinada con otras técnicas (tales como: ATD, DRX y MEB-EC-EDS), es una técnica adecuada para establecer el mecanismo de desvitrificación de vidrios.

2).- Los resultados experimentales indican que la desvitrificación del vidrio ocurre en sucesivas etapas, además es posible obtener una variedad de vitrocerámicos mediante la modificación del tratamiento térmico.

3).- De la variedad de materiales que se pueden conseguir, al desvitrificar el vidrio, se decidió obtener un vitrocerámico con apatita y wollastonita 2M, ya que la primera es una fase biocompatible y presenta una fuerte unión al hueso, mientras que la segunda mejora las propiedades mecánicas del material y además es una fase reabsorbible.



4).- El ciclo térmico para obtener el vitrocerámico con las fases antes mencionadas se estableció mediante los estudios de desvitrificación, estableciéndose como tratamiento térmico un ciclo con dos etapas una a 820°C durante 2 horas y otro a 1100°C durante 1h.

- De la caracterización del vitrocerámico se concluye que:

1).- Las fases presentes en el mismo son: apatita deficiente en calcio (44,8 % peso), wollastonita 2M (28,0 % peso) y una fase amorfa residual (27,2%).

2).- De los estudios Rietveld y del análisis racional se ha encontrado que la fase apatita deficiente en calcio presenta pequeñas cantidades de SiO<sub>2</sub> (0,45 moles) y que la fase amorfa presenta la siguiente composición en peso: CaO 43,5 %, SiO<sub>2</sub> 55,9 % y P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0,6%.

3).- Las propiedades mecánicas (E, H<sub>v</sub> y K<sub>IC</sub>) del vitrocerámico son mejores que las del vidrio original y similares a los de otros vitrocerámicos con aplicaciones como biomateriales comerciales.

4).- Los estudios *in vitro* indican que es bioactivo, formando una capa de carbohidroxiapatita después de 7 días de inmersión en SFA y además las células HBMSC sembradas sobre su superficie presentan alta adhesión y proliferación celular, lo que indica que es biocompatible.

5).- El proceso de obtención usado en la presente tesis: desvitrificación de un vidrio en masa, es decir sin moler y prensar el vidrio, es un proceso de preparación simple. En comparación con otros utilizados en la obtención biomateriales vitrocerámicos con aplicaciones comerciales y clínica (ej. Cerabone), es un proceso que presenta una menor susceptibilidad de contaminación y por ende un menor coste de fabricación de los implantes.

- A partir del vidrio de composición eutéctica del sistema W-TCP es posible obtener un amplio rango de biomateriales, con diferentes fases cristalinas, proporciones y diferente microestructura, permitiendo obtener una variedad de biomateriales con diferentes propiedades.

## **OVERALL CONCLUSIONS**



The individual chapters of the thesis have already discussed the results and listed the main conclusions. This chapter summarizes only the most important findings of this research that have allowed achieving the main objectives of the study.

- A glass-ceramic parent glass, with the eutectic point composition of the wollastonite–tricalcium phosphate (W–TCP) system, was obtained by a glass processing conventional method based on melting and casting. The following conclusions have been drawn based on the material's characterisation results:

1).- The mechanical properties of the bulk glass are comparable to other bioactive glasses reported in the bibliography.

2).- The correlation, established by Aguiar et al., between Stevels parameter and bioactivity in SBF was validated. An empirical relationship was established to predict the bioactivity of silica-phosphate alkali/alkaline earth glasses:

$$\text{Ca and P layer thickness } (\mu\text{m}) = \frac{2.679 - \text{Stevels Parameter}}{0.174}$$

This relationship is applicable for  $0.82 \leq \text{Stevels parameter} < 2.679$  after 3 days immersion in SBF.

3).- The new glass had high bioactivity in SBF, and formed calcium phosphate layer, 24  $\mu\text{m}$  thick, after 21 days exposure to SBF.

4).- MG63 cells, from a human osteosarcoma, seeded onto the glass showed strong adhesion and quick proliferation on the glass surface.

- The following conclusions have been drawn from the devitrification studies of the W-TCP eutectic glass:

1).- Neutron Diffraction, combined with other techniques such as DTA, XRD and FE-SEM/EDS are very important and powerful techniques in establishing the mechanism of the glasses' devitrification.

2).- The experimental results indicated that the devitrification of the glass took place in successive stages, and that it was possible to obtain a wide range of bio-glass-ceramics containing different crystalline phases, by applying appropriate heat treatment procedures.

3).- Among different materials that can be manufactured by varying the heat treatment, it was decided to produce a glass-ceramic containing apatite and wollastonite-2M. This conclusion was based on the fact that the apatite phase is biocompatible and has a strong chemical bonding, while the wollastonite-2M phase improves the mechanical properties of the material and it is also resorbable.

4).- The newly designed thermal cycle in this study that allowed the devitrification process of the bulk glass to obtain the glass-ceramic containing apatite and wollastonite-2M was based on the previous devitrification studies. This thermal cycle consist of two dwell-steps, one of 2 hours at 820°C and another of 1 hour at 1100°C.

- The characterization results of the new glass-ceramic obtained by the devitrification of the parent glass allowed to conclude as follows:

1).- The crack-free specimens were composed of 44.8 wt% Ca-deficient apatite, 28.0 wt% wollastonite-2M and 27.2 wt% of amorphous phase.

2).- A combination of the Rietveld and rational analyses data found that the calcium deficient apatite phase had a small amounts of SiO<sub>2</sub> (0.45 mol) phase in solid solution, and that the amorphous phase was composed of CaO 43.5 %wt., SiO<sub>2</sub> 55.9%wt. and P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 0.6%wt.

3).- The mechanical properties (E, H<sub>v</sub> and K<sub>IC</sub>) of the glass-ceramic were better than that of the original parent glass and comparable to other glass-ceramic biomaterials with commercial and clinical success (e.g. Cerabone®).

4).- *In vitro* studies indicated that the new glass-ceramic was bioactive forming a layer of carbonated hydroxyapatite after 7 days of immersion in SBF. The glass was also biocompatible, as it was found that HBMSC seeded onto its surfaces exhibited strong cell adhesion and quick proliferation.

5).- The manufacturing process used in this research, which involved devitrification from a bulk glass, without glass grinding or isostatic pressing, is a much simpler preparation method. In comparison with other glass-ceramic biomaterials with commercial and clinical success (e.g. Cerabone®), this new procedure is also less susceptible to contamination and presents overall lower manufacturing cost of implants.

- The study proved that it is possible to obtain a wide range of bio-glass-ceramics composed of different crystalline phases, phase proportions and also various microstructures, using the same starting material of W-TCP eutectic composition bulk glass. This finding opens the new possibility for production of various biomaterials of different properties using the devitrification process proposed in this thesis.

**ANEXO**

**FUTURAS APLICACIONES Y LÍNEAS DE  
INVESTIGACIÓN PARA LOS MATERIALES  
DESARROLLADOS EN LA PRESENTE TESIS  
DOCTORAL**





## **ANEXO**

### **1.Futuras aplicaciones de los materiales desarrollados**

Como se ha observado en la presente investigación los materiales desarrollados, tanto el vidrio eutéctico como el vitrocerámico conteniendo Ap dCa y wollastonita 2M, han presentado alta bioactividad y biocompatibilidad *in vitro*. Esto los presenta como buenos candidatos para ser usados en aplicaciones biomédicas, como sustitutos óseos. Las propiedades mecánicas del vidrio, como los vidrios en general, limitan su uso a zonas de bajas solicitudes mecánicas. Por otro lado, el vitrocerámico obtenido puede ser usado en zonas donde se requieran mayores propiedades mecánicas, si se compara con el vidrio. Entre estas aplicaciones se encuentran: reconstrucción maxilofacial, fusión de vértebras de la columna, reconstrucción de la cresta ilíaca y reconstrucción del oído medio.

Lo interesante de la investigación realizada es que se ha logrado obtener un vitrocerámico compuesto por apatita y wollastonita 2M desde una muestra en masa, evitándose así moler y prensar el vidrio antes de su tratamiento térmico. Con este logro es posible obtener piezas con formas complejas y además piezas huecas, mediante la técnica de soplado. Las piezas huecas pueden ser usadas para simular el hueso cortical y usarlo para ingeniería de tejidos, como se explicará más adelante.

### **2.Futuras líneas de investigación para los materiales desarrollados.**

#### **2.1.El vidrio eutéctico del sistema W-TCP como aditivo en cementos de $\alpha$ -TCP.**

##### *Introducción*

Entre las principales ventajas de los materiales de fosfato de calcio están: su similitud con la composición de la fase inorgánica del hueso, su bioactividad, osteoconductividad y su habilidad para formar una unión fuerte con el hueso [1]. A diferencia de las biocerámicas de fosfato de calcio en gránulos o pre-conformadas, los cementos de fosfatos de calcio (CFC) tienen la ventaja de poder adaptarse a la forma del defecto óseo e integrarse rápidamente a la estructura del hueso. Sin embargo presentan una limitación debido a su lenta biodegradación *in vivo* [2-4].

Uno de los CFC más estudiados es el  $\alpha$ -TCP, que en medio acuoso se hidroliza mediante una reacción tipo cemento, formando Ap dCa. La estabilidad de esta fase en medio

fisiológico impide su biodegradación y sustitución por nuevo hueso, lo que produce que después de la implantación permanezca denso, por lo tanto, no forma macroporosidad que permita la colonización de las células y crecimiento de tejido óseo [5]. Se están realizando diferentes investigaciones con el objetivo de desarrollar formulaciones de CFC con aditivos que no se transformen en apatita al mezclarse con un medio acuoso, lo que aumenta sus propiedades de disolución *in vivo*, produciendo macroporosidades en la matriz del cemento permitiendo la colonización y crecimiento del tejido dentro de éste [2;6-9]. Entre los aditivos usados hasta el momento se encuentran: el fosfato de calcio amorfo, carbonato de calcio, fosfato dicálcico.

Igualmente se están realizando investigaciones para desarrollar CFC con aditivos que modifiquen la Ap dCa que se forma de la hidrólisis. Por ejemplo, al usar fosfatos de calcio amorfo conteniendo iones flúor como aditivo, se produce la conversión de éste a una fluorapatita que facilita su uso en aplicaciones odontológicas [10].

Por todo lo expuesto anteriormente, una futura línea de investigación se encuentra en el uso del vidrio eutéctico como aditivo en cementos de  $\alpha$ -TCP. En una primera visión, el silicio presente en el cemento con aditivo, proveniente del vidrio, permitirá aumentar la respuesta celular, actuando en la expresión de ciertos genes responsables del control del ciclo celular de los osteoblastos animales y humanos, y estimular así la osteoproducción [11-15].

### *Estudio preliminar*

#### *Materiales y método*

El  $\alpha$ -TCP fue obtenido mediante tratamiento térmico del  $\beta$ -TCP a 1500°C durante 4 horas, y molienda (molino de atrición, bolas de Y-TZP e isopropanol). La suspensión de  $\alpha$ -TCP se secó y se tamizó. Se utilizó como aditivo el vidrio eutéctico molido con un tamaño menor a 63  $\mu$ m. Como medio acuoso se utilizó óxido de deuterio (D<sub>2</sub>O, Merck, Germany) y fosfato disódico hidrogenado (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), mediante una solución de 2,5 peso/vol. % de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en D<sub>2</sub>O. Para preparar la pasta de cemento, primero se mezcló el  $\alpha$ -TCP con el vidrio (en una relación % peso 90/10 respectivamente), obteniéndose en total 3 g de polvo. La pasta fue obtenida añadiendo 1,5 ml de medio acuoso a la mezcla de polvo, mezclándose cuidadosamente durante 1 min. Posteriormente, la pasta fue transferida a un crisol de vanadio, el cual se mantuvo en un tubo de poliestireno, conteniendo 0,5 ml de

D<sub>2</sub>O con el fin de evitar el secado de las muestras, a  $36,5 \pm 1,5^{\circ}\text{C}$  hasta que se realizaron las medidas.

La evolución de la pasta obtenida se monitorizó mediante Difracción de Neutrones (DN) a diferentes períodos de tiempo.

Por otro lado, también se ha realizado el mismo estudio pero para un cemento de  $\alpha$ -TCP sin aditivo, para comparar el efecto del vidrio en la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP.

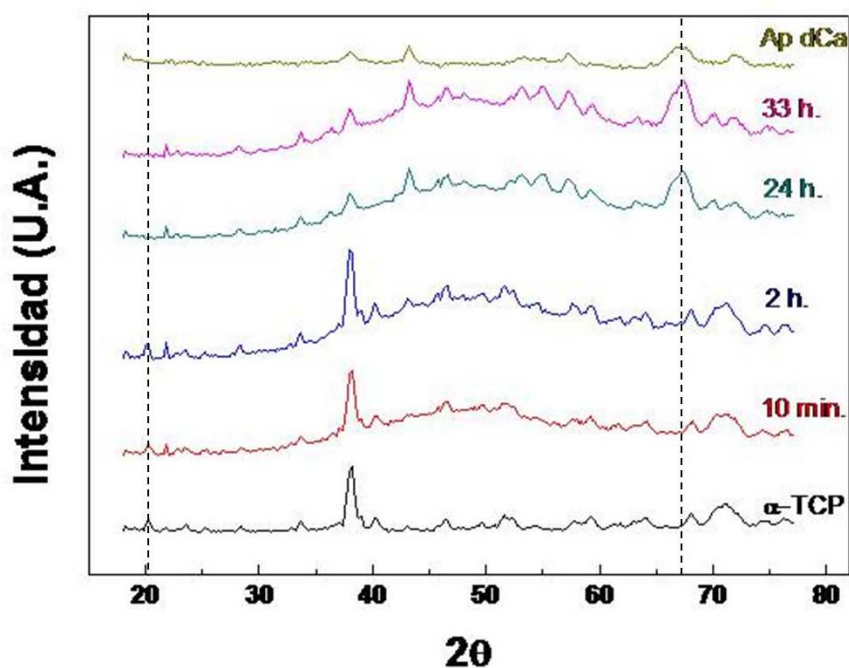
### *Resultados y discusión*

Las figuras 10.1 y 10.2, muestran la evolución para los cementos:  $\alpha$ -TCP y  $\alpha$ -TCP-Vidrio, sin aditivo y con el vidrio eutéctico como aditivo, respectivamente, obtenidas mediante DN.

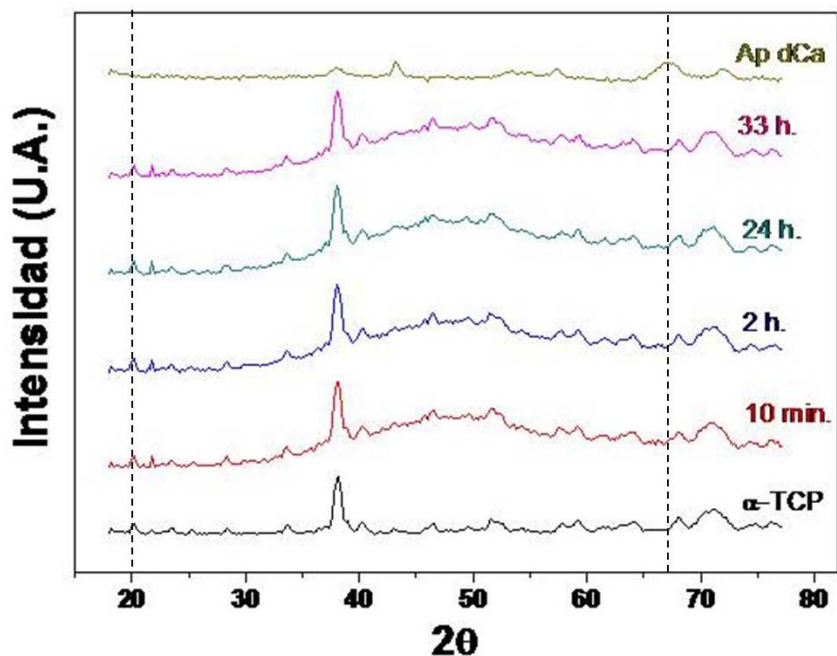
En la figura 10.1, se observa que después de 2 horas de la preparación del cemento  $\alpha$ -TCP se observan trazas de Ap dCa, lo que indica que se ha iniciado la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP a Ap dCa. Para esta muestra la transformación ya se ha completado después de 24 horas de preparación.

Para el cemento  $\alpha$ -TCP-vidrio después de 33 horas de preparación del cemento no existe un indicativo claro de que se ha iniciado la hidrólisis del cemento para formar Ap dCa. (figuras 10.2),

Al comparar los resultados, se observa que el vidrio afecta la hidrólisis del  $\alpha$ -TCP, retardando la formación de Ap dCa en el cemento, un resultado similar se presenta para el CaCO<sub>3</sub> como aditivo en cementos de  $\alpha$ -TCP [16].



**Figura 10.1.** Resultados de la DN para la pasta de  $\alpha$ -TCP después de 10min, 2, 24 y 33 horas de haberse preparado. Con fines comparativos se muestra la línea  $\alpha$ -TCP y Ap dCa.



**Figura 10.2.** Resultados de la DN para la pasta de  $\alpha$ -TCP-Vidrio después de 10min, 2, 24 y 33 horas de haberse preparado. Con fines comparativos se muestra la línea  $\alpha$ -TCP y Ap dCa.

La inhibición momentánea de la formación de Ap dCa en el cemento puede ser un campo de investigación interesante, al no ocurrir la transformación de  $\alpha$ -TCP a Ap dCa la disolución *in vivo* del implante podría aumentar, aumentando por ende la probabilidad de colonización del mismo. Como no se han realizado ensayos a mayores períodos de tiempos ( $> 33$  horas) no se ha establecido si la transformación  $\alpha$ -TCP a Ap dCa no ocurre total o parcialmente. Por lo tanto, se pueden dar dos escenarios: que ocurra la transformación, pero formándose al final Ap dCa con silicio en su estructura, lo que aumenta su disolución [17-24]; o que permanezca vidrio de la mezcla sin transformarse, entonces esta fase se disolverá *in vivo*, produciendo poros que permitirán la colonización del mismo.

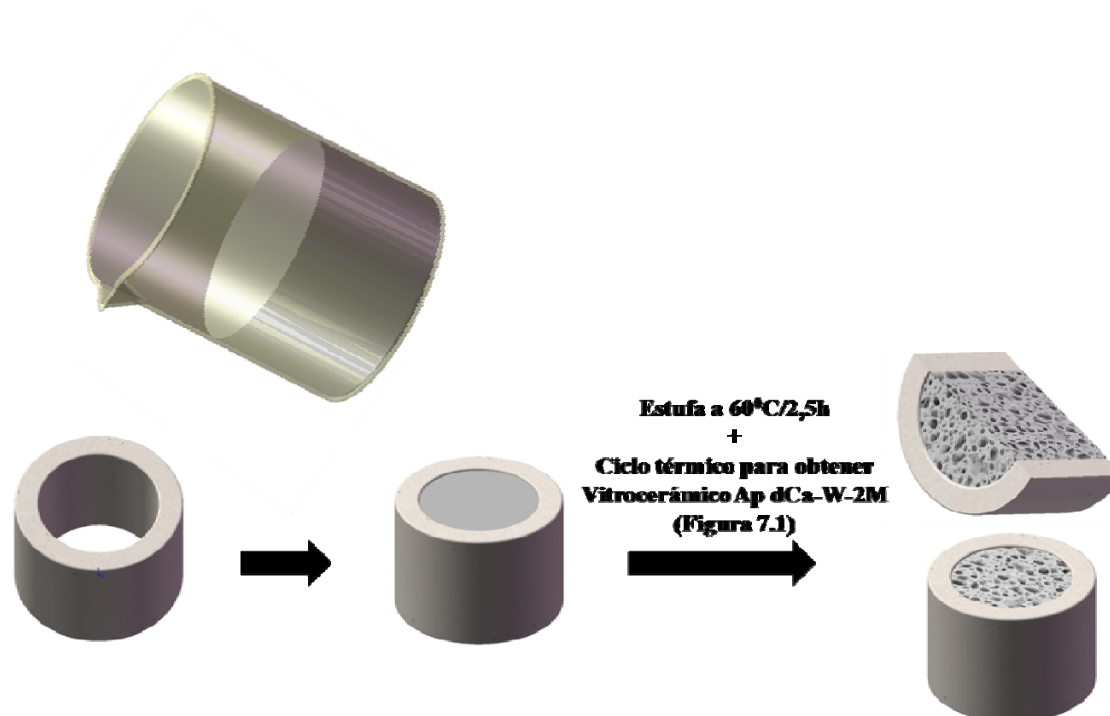
## **2.2.Desarrollo de piezas huecas de vitrocerámico Apatita- Wollastonita 2M para ingeniería de tejidos.**

### *Introducción*

El objetivo primordial de la ingeniería de tejidos es incitar y promover el proceso natural de curación, el cual no ocurre en defectos con tamaño crítico. Un material usado en ingeniería de tejido debe ser biocompatible, biodegradable, que permita una integración natural con el tejido, además debe simular la estructura multidimensional jerárquica del hueso natural [25].

La mayoría de los materiales desarrollados para la ingeniería de tejido se centran en satisfacer el tamaño de poro que corresponde al hueso esponjoso, es decir, obtener andamios con porosidades mayores a 200  $\mu\text{m}$ , con el objetivo de permitir la vascularización del implante.

Con el objetivo de simular las diferentes dimensiones jerárquicas presentes en el hueso natural (desde la escala nanométrica hasta la milimétrica), se propone una línea de investigación en la que se obtengan piezas huecas (grosos entre 1 y 4 mm) de vidrio eutéctico, las cuales serán rellenas con suspensiones, y tratadas térmicamente con el ciclo térmico establecido en el presente trabajo para obtener un vitrocerámico compuesto por apatita y wollastonita 2M. Simulando el carácter multidimensional del hueso natural (véase figura 10.3).



**Figura 10.3.** Material para simular las diferentes dimensiones jerárquicas presentes en el hueso natural. Desarrollado a partir de una pieza hueca de vidrio eutéctico y una suspensión conteniendo este mismo vidrio.

### *Estudio preliminar*

#### *Materiales y método*

Primero se obtuvo una placa de vidrio de composición eutéctica (15 x 7 x 25 mm<sup>3</sup>), mediante el uso de brocas de 7 y 10 mm de diámetro se obtuvo una pieza hueca, como la que se muestra en la figura 10.3.

Para preparar la suspensión se usó el procedimiento establecido en diferentes referencias bibliográficas [26-28]. Para ello el vidrio se molió en un molino de WC hasta un tamaño menor a 63  $\mu\text{m}$ . Este polvo se mezcló con una solución de peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ -10%vol/vol., con una relación %peso vidrio: $\text{H}_2\text{O}_2$  igual a 40:60).

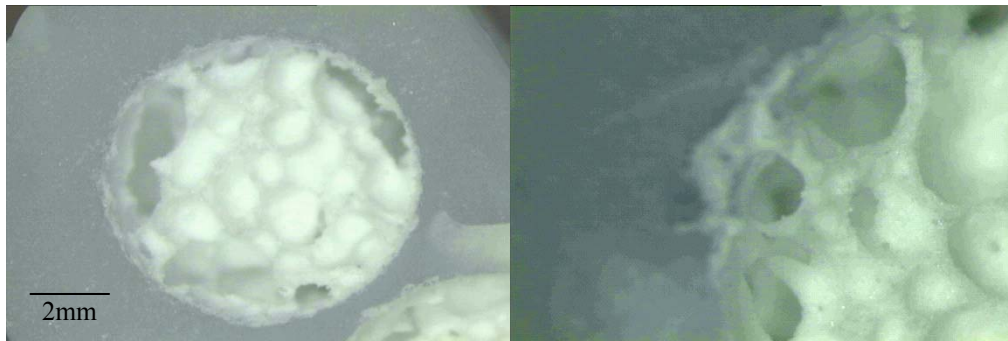
Esta suspensión se vació en el hueco de la pieza de vidrio (véase figura 10.3), posteriormente la pieza con la suspensión se mantuvo en una estufa a 60°C durante 2,5 horas.

Finalmente, se trató térmicamente usando el ciclo establecido en el presente trabajo para obtener un vitrocerámico conteniendo Ap dCa y wollastonita 2M (véase capítulo VII, figura 7.1).

La pieza obtenida se muestra en la figura 10.4, donde es posible observar una zona densa, que simula el hueso cortical y otra porosa, con porosidad abierta y cerrada que simula el hueso esponjoso.

Solo se ha obtenido la muestra que simula el hueso en sus diversas escalas, en un futuro se realizarán ensayos *in vitro* en cultivos celulares para determinar si esta estructura multidimensional mejora la respuesta celular.

Además se propone usar como suspensión otros materiales diferentes al vidrio eutéctico del sistema W-TCP. Siempre teniendo presente que la zona simulada del hueso cortical con el vitrocerámico, desarrollado en la presente tesis doctoral, liberará silicio y calcio al medio, lo que mejorará la respuesta celular.



**Figura 10.4.** Pieza de vitrocerámico obtenido mediante el procedimiento de la figura 10.3, es posible observar una zona densa y otra porosa, que simulan el hueso cortical y esponjoso, respectivamente.

## REFERENCIAS

- [1] R. Z. LeGeros, "Properties of osteoconductive biomaterials: Calcium phosphates," *Clinical Orthopaedics and Related Research*, no. 395, pp. 81-98, 2002.
- [2] I. Khairoun, D. Magne, O. Gauthier, J. M. Bouler, E. Aguado, G. Daculsi, and P. Weiss, "In vitro characterization and in vivo properties of a carbonated apatite bone cement," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 60, no. 4, pp. 633-642, 2002.
- [3] S. Rupprecht, H. A. Merten, P. Kessler, and J. Wiltfang, "Hydroxyapatite cement (BoneSource (TM)) for repair of critical sized calvarian defects - an experimental study," *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*, vol. 31, no. 3, pp. 149-153, 2003.
- [4] J. M. Smartt, J. Karmacharya, F. H. Gannon, G. Ong, O. Jackson, S. P. Bartlett, R. D. Poser, and R. E. Kirschner, "Repair of the immature and mature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate cement: Assessment of biocompatibility, osteoconductivity, and remodeling capacity," *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 115, no. 6, pp. 1642-1650, 2005.
- [5] M. Julien, I. Khairoun, R. Z. LeGeros, S. Delplace, P. Pilet, P. Weiss, G. Daculsi, J. M. Bouler, and J. Guicheux, "Physico-chemical-mechanical and in vitro biological properties of calcium phosphate cements with doped amorphous calcium phosphates," *Biomaterials*, vol. 28, no. 6, pp. 956-965, 2007.
- [6] A. Citeau, J. Guicheux, C. Vinatier, P. Layrolle, T. P. Nguyen, P. Pilet, and G. Daculsi, "In vitro biological effects of titanium rough surface obtained by calcium phosphate grid blasting," *Biomaterials*, vol. 26, no. 2, pp. 157-165, 2005.
- [7] D. Magne, G. Bluteau, C. Fauchoux, G. Palmer, C. Vignes-Colombeix, P. Pilet, T. Rouillon, J. Caverzasio, P. Weiss, G. Daculsi, and J. Guicheux, "Phosphate is a specific signal for ATDC5 chondrocyte maturation and apoptosis-associated mineralization: Possible implication of apoptosis in the regulation of endochondral ossification," *Journal of Bone and Mineral Research*, vol. 18, no. 8, pp. 1430-1442, 2003.
- [8] B. Relic, J. Guicheux, F. Mezin, E. Lubberts, D. Togninalli, I. Garcia, W. B. van den Berg, and P. A. Guerne, "IL-4 and IL-13, but not IL-10, protect human synoviocytes from apoptosis," *Journal of Immunology*, vol. 166, no. 4, pp. 2775-2782, 2001.
- [9] H. Sudo, H. A. Kodama, Y. Amagai, S. Yamamoto, and S. Kasai, "Invitro Differentiation and Calcification in A New Clonal Osteogenic Cell-Line Derived from Newborn Mouse Calvaria," *Journal of Cell Biology*, vol. 96, no. 1, pp. 191-198, 1983.
- [10] R. Z. LeGeros, *Calcium phosphates in orla biology and medicine. Monographs in orl sciences*. Karger: Basel, 1991.
- [11] L. L. Hench, "Glass and genes: The 2001 W. E. S. Turner Memorial Lecture," *Glass Technology*, vol. 44, no. 1, pp. 1-10, 2003.
- [12] E. M. Carlisle, "Biochemical and Morphological-Changes Associated with Long-Bone Abnormalities in Silicon Deficiency," *Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 5, pp. 1046-1056, 1980.



- [13] E. M. Carlisle, "Silicon Requirement for Normal Skull Formation in Chicks," *Journal of Nutrition*, vol. 110, no. 2, pp. 352-359, 1980.
- [14] I. D. Xynos, A. J. Edgar, L. D. K. Buttery, L. L. Hench, and J. M. Polak, "Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass (R) 45S5 dissolution," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 55, no. 2, pp. 151-157, 2001.
- [15] C. Knabe, G. Berger, R. Gildenhaar, J. Meyer, C. R. Howlett, B. Markovic, and H. Zreiqat, "Effect of rapidly resorbable calcium phosphates and a calcium phosphate bone cement on the expression of bone-related genes and proteins in vitro," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 69A, no. 1, pp. 145-154, 2004.
- [16] C. Durucan and P. W. Brown, "Reactivity of alpha-tricalcium phosphate," *Journal of Materials Science*, vol. 37, no. 5, pp. 963-969, 2002.
- [17] N. Patel, S. M. Best, W. Bonfield, I. R. Gibson, K. A. Hing, E. Damien, and P. A. Revell, "A comparative study on the in vivo behavior of hydroxyapatite and silicon substituted hydroxyapatite granules," *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, vol. 13, no. 12, pp. 1199-1206, 2002.
- [18] A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Comparison of in vivo dissolution processes in hydroxyapatite and silicon-substituted hydroxyapatite bioceramics," *Biomaterials*, vol. 24, no. 25, pp. 4609-4620, 2003.
- [19] A. E. Porter, N. Patel, J. N. Skepper, S. M. Best, and W. Bonfield, "Effect of sintered silicate-substituted hydroxyapatite on remodelling processes at the bone-implant interface," *Biomaterials*, vol. 25, no. 16, pp. 3303-3314, 2004.
- [20] I. R. Gibson, K. A. Hing, P. A. Revell, J. D. Santos, S. M. Best, and W. Bonfield, "Enhanced in vivo response to silicate-substituted hydroxyapatite," *Bioceramics 14*, vol. 218-2, pp. 203-206, 2002.
- [21] C. M. Botelho, R. A. Brooks, S. M. Best, M. A. Lopes, J. D. Santos, N. Rushton, and W. Bonfield, "Human osteoblast response to silicon-substituted hydroxyapatite," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 79A, no. 3, pp. 723-730, 2006.
- [22] E. S. Thian, J. Huang, M. E. Vickers, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite (SiHA): A novel calcium phosphate coating for biomedical applications," *Journal of Materials Science*, vol. 41, no. 3, pp. 709-717, 2006.
- [23] E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite: The next generation of bioactive coatings," *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, vol. 27, no. 2, pp. 251-256, 2007.
- [24] E. S. Thian, J. Huang, S. M. Best, Z. H. Barber, and W. Bonfield, "Silicon-substituted hydroxyapatite thin films: Effect of annealing temperature on coating stability and bioactivity," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 78A, no. 1, pp. 121-128, 2006.
- [25] J. R. Porter, T. T. Ruckh, and K. C. Papat, "Bone Tissue Engineering: A Review in Bone Biomimetics and Drug Delivery Strategies," *Biotechnology Progress*, vol. 25, no. 6, pp. 1539-1560, 2009.

- [26] M. Navarro, S. del Valle, S. Martinez, S. Zeppetelli, L. Ambrosio, J. A. Planell, and M. P. Ginebra, "New macroporous calcium phosphate glass ceramic for guided bone regeneration," *Biomaterials*, vol. 25, no. 18, pp. 4233-4241, 2004.
- [27] H. P. Yuan, J. D. de Bruijn, X. D. Zhang, C. A. van Blitterswijk, and K. de Groot, "Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass (R) (45S5)," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 58, no. 3, pp. 270-276, 2001.
- [28] E. Fidancevska, G. Ruseska, J. Bossert, Y. M. Lin, and A. R. Boccaccini, "Fabrication and characterization of porous bioceramic composites based on hydroxyapatite and titania," *Materials Chemistry and Physics*, vol. 103, no. 1, pp. 95-100, 2007.